

Chemische Signalbouquets von Säugetieren

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Jana Caspers
aus Varel

1. Referent: Professor Dr. Stefan Schulz
2. Referent: Professor Dr. Thomas Lindel
eingereicht am: 17.12.2018
mündliche Prüfung (Disputation) am: 08.03.2019

Druckjahr 2019

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Posterbeiträge

Caspers, J., Miyazaki, M., Schulz, S.: Flehmen Behaviour – A Chemical Way How Cats Communicate. (Poster) 5. Braunschweiger Jungchemiker Tagung, Braunschweig (2014).

Caspers, J., Miyazaki, M., Schulz, S.: Flehmen behaviour and the chemical basis of cat communication. (Poster) 27. Irseer Naturstofftage, Irsee (2015).

Caspers, J., Miyazaki, M., Schulz, S.: The chemical basis of flehmen behaviour in domestic cats. (Poster) International Society of Chemical Ecology, Stockholm (2015).

Für meine Eltern
und meine Oma Gertrud

Abkürzungsverzeichnis

$[\alpha]_D$	spezifischer Drehwert
δ	chemische Verschiebung
abs.	absolutiert
äq	Äquivalente
ber.	berechnet
CDCl_3	Deuterochloroform
CH_2Cl_2	Dichlormethan
CuI	Kupferiodid
$\text{CuBr} \cdot \text{SMe}_2$	Kupferbromiddisulfid-Komplex
d	Dublett
dd	Dublett von Dublett
dt	Dublett von Triplett
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DFA	Diskriminanzanalyse (Discrimination Function Analysis)
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMDS	Dimethyldisulfid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ee	enantiomeric excess (Enantiomerenüberschuss)
EI	Electron Impact
ESI	Elektrospray Ionisation

<i>et al.</i>	und andere
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie gekoppelte mit Massenspektrometrie
h	Stunden
HMPA	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz [s ⁻¹]
i.D.	innerer Durchmesser
<i>J</i>	Kopplungskonstante [Hz]
kat.	Katalytisch
KHMDS	Kaliumhexamethyldisilazid
KOH	Kaliumhydroxid
KO ^{<i>t</i>} Bu	Kalium- <i>tert</i> -Butanolat
LDA	Lithiumdiisopropylamin
LiOH	Lithiumhydroxid
Lit.	Literaturdaten
m	Multiplett
[M] ⁺	Molekularion
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MeMgBr	Methylmagnesiumbromid
MeMgCl	Methylmagnesiumchlorid

MOS	Riechepithel, main olfactory system
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl)-2,2,2-trifluoracetamid
<i>m/z</i>	Masse pro Elementarladung
<i>n</i> BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
NMR	Kernresonanzspektroskopie
ppm	parts per million
q	Quartett
quin	Quintett
R_f	ratio of fronts
RI	Retentionsindex
RT [°C]	Raumtemperatur
RT [min]	Retentionszeit
s	Singulett
SPME	solid phase micro extraction (Festphasenmikroextraktion)
t	Triplett
<i>t</i> BME	<i>tert</i> -Butylmethylether
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilan
TMSCl	Chlortrimethylsilan
Tol-BINAP	2,2'-Bis(di- <i>p</i> -tolylphosphino)-1,1'-binaphthyl
UV	Ultraviolett
VNO	vomeronasal Organ

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Themenstellung	11
3	Identifizierung und Synthese von Fettsäuren aus flehmeninduzierenden Urinextrakten von Hauskatzen	12
3.1	Einleitung	12
3.2	Analyse der Urinextrakte	18
3.3	Strukturaufklärung, Synthese und Biotests	43
3.3.1	3-Methyldodecansäure (45)	44
3.3.2	3-Methylundecansäure (44)	46
3.3.3	3-Methyldecansäure (43)	47
3.3.4	3,9-Dimethyldecansäure (87)	51
3.3.5	(<i>E</i>)-2-Ethyl-2-octensäure (96)	56
3.3.6	(<i>E</i>)-2,4-Diethyl-2-hexensäure (72)	58
3.3.7	4-Ethylhexadecansäure (73)	60
3.3.8	Individuelle Erkennung in Katzen	62
4	Analyse von Urinextrakten von Mausmakis	63
4.1	Einleitung	63
4.2	Methodenentwicklung	66
4.3	Ergebnisse und Diskussion	69
4.3.1	Hauptkomponenten	69
4.3.2	Unterschiede zwischen den Geschlechtern	73
4.3.3	Unterschiede zwischen den Arten	80
4.3.4	Fazit	82
5	Zusammenfassung und Ausblick	84
6	Experimenteller Teil	87
6.1	Allgemeine Informationen	87
6.1.1	Synthese	87

6.1.2	Dünnschicht- und Säulenchromatographie	87
6.1.3	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	87
6.1.4	Gaschromatographische Trennungen an chiraler Phase (GC)	88
6.1.5	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung	88
6.1.6	Polarimetrie	89
6.1.7	Urinproben von Mausmakis	89
6.1.8	Urinextrakte von Mausmakis	89
6.1.9	Statistische Analyse	90
6.2	Derivatisierungen	90
6.2.1	Silylierung von Alkoholen und Säuren	90
6.2.2	Veresterung zu Methylestern mit Diazomethan	91
6.3	Allgemeine Arbeitsvorschriften	91
6.3.1	Wittig Reaktion	91
6.3.2	Konjugierte Addition an α,β -ungesättigte Ester	91
6.3.3	Verseifung von Methylestern	92
6.3.4	Enantioselektive konjugierte Addition an α,β -ungesättigte Ester mit Tol-BINAP	92
6.4	Synthese	92
6.4.1	2-Dodecensäuremethylester (79)	92
6.4.2	3-Methyldodecansäuremethylester (30)	93
6.4.3	3-Methyldodecansäure (45)	94
6.4.4	2-Undecensäuremethylester (78)	95
6.4.5	3-Methylundecansäuremethylester (29)	95
6.4.6	3-Methylundecansäure (44)	96
6.4.7	2-Decensäuremethylester (77)	97
6.4.8	3-Methyldecansäuremethylester (80)	97
6.4.9	3-Methyldecansäure (43)	98
6.4.10	(<i>R</i>)-3-Methyldecansäuremethylester (28)	99

6.4.11	(<i>R</i>)-Methyldecansäure (85).....	100
6.4.12	(<i>S</i>)-3-Methyldecansäuremethylester (84)	100
6.4.13	(<i>S</i>)-3-Methyldecansäure (86).....	101
6.4.14	1-Brom-4-methylpentan (89).....	102
6.4.15	7-Methyloctansäuremethylester (90)	103
6.4.16	7-Methyloctanal (91).....	104
6.4.17	9-Methyl-2-decensäuremethylester (92).....	104
6.4.18	3,9-Dimethyldecansäuremethylester (81).....	105
6.4.19	3,9-Dimethyldecansäure (87)	106
6.4.20	(<i>R</i>)-3,9-Dimethyldecansäuremethylester (31).....	106
6.4.21	(<i>R</i>)-3,9-Dimethyldecansäure (94)	107
6.4.22	(<i>S</i>)-3,9-Dimethyldecansäuremethylester (93).....	108
6.4.23	(<i>S</i>)-3,9-Dimethyldecansäure (95).....	109
6.4.24	2-Diethylphosphonobutansäuremethylester (98).....	109
6.4.25	(<i>E</i>)-2-Ethyl-2-octensäuremethylester (32).....	110
6.4.26	(<i>E</i>)-2-Ethyl-2-octensäure (96)	111
6.4.27	(<i>E</i>)-2,4-Diethyl-2-hexensäuremethylester (47).....	112
6.4.28	(<i>E</i>)-2,4-Diethyl-2-hexensäure (72)	113
6.4.29	Tetradecansäure- <i>tert</i> -butylester (100)	113
6.4.30	2-Ethyltetradecansäure- <i>tert</i> -butylester (101)	114
6.4.31	2-Ethyl-1-tetradecanol (102)	115
6.4.32	2-Ethyltetradecanal (103)	116
6.4.33	4-Ethyl-2-hexadecensäuremethylester (104).....	117
6.4.34	4-Ethylhexadecansäuremethylester (36)	118
6.4.35	4-Ethylhexadecansäure (73).....	118
7	Literaturverzeichnis	120
8	Anhang	129
8.1	Zusammenfassung der Diskriminanzanalyse	129

8.1.1	Diskriminanzanalyse Geschlechter	129
8.1.2	Diskriminanzanalyse Arten.....	130
8.2	Massenspektren der unbekannten Verbindungen in den Urinprofilen von männlichen und weiblichen Mausmakis	130
8.2.1	Männliche Mausmakis U1 – U3	130
8.2.2	Weibliche Mausmakis U4 – U22	131
8.3	Massenspektren der unbekannten Verbindungen in den Urinprofilen von <i>M. murinus</i> und <i>M. lehilahytsara</i>	134
8.3.1	<i>Microcebus murinus</i> U23 – U28	134
8.3.2	<i>Microcebus lehilahytsara</i> U29 – U35	135
8.4	Auswertung der Urinextrakte Mausmakis – CD	136

1 Einleitung

Anfang 2018 gab es insgesamt 6399 unterschiedliche, rezente Säugetierarten.^[1] Diese Diversität der Arten spiegelt sich in ihren vielfältigen Möglichkeiten zu kommunizieren wider. Viele Säugetiere nutzen die Stimme zur Kommunikation mit Anderen. Neben der menschlichen Stimme werden auch weitere Frequenzbereiche von Säugetieren zur Kommunikation genutzt, beispielsweise nutzen Fledermäuse und Nagetiere Ultraschalllaute. Wale und Elefanten hingegen verwenden Infraschalllaute weit unter unserem Hörbereich.^[2] Sehr unterschiedliche Informationen werden durch Laute weitergegeben, zum Beispiel Lockrufe, Warnrufe, Paarungsrufe, Gruppenrufe, Mutter-Kind-Kommunikation und so weiter. Neben der Vokalisierung spielt im Tierreich genauso wie bei den Menschen die Körpersprache und Mimik eine wichtige Rolle. Dabei werden ebenfalls verschiedenste Emotionen und Aufforderungen übertragen, allerdings muss der Gegenüber dafür in Sichtweite sein. Im Gegensatz zu den Menschen verwenden Säugetiere auch noch die chemische Kommunikation zur Informationsübertragung. Sie verlassen sich sehr stark auf Botenstoffe und Pheromone, allgemein unter dem Begriff Semiochemikalien zusammengefasst. Ob diese bei den Menschen auch existieren, wird immer noch kontrovers diskutiert. Semiochemikalien wurden jedoch nicht nur bei Säugetieren identifiziert, sondern treten auch bei Insekten, Fischen, Arthropoden, Pflanzen, Pilzen und Bakterien auf.

Botenstoffe dienen den Tieren zur interspezifischen Kommunikation und werden auch Allelochemikalien genannt. Sie werden je nach Art der Funktion in Allomone, Kairomone und Synomone unterschieden.^[3] Allomone sind Verbindungen die dem „Sender“ nutzen, aber nicht dem „Empfänger“, wie es bei Wehrsekreten von Insekten zum Beispiel der Fall ist.^{[3],[4]} Kairomone sind das Gegenteil von Allomone, sie sind vorteilhaft für den „Empfänger“, aber nicht für den „Sender“. Ein Beispiel dafür sind Pheromone, die Räuber abhalten. Synomone bieten beiden Parteien dagegen einen Vorteil.

Neben den Botenstoffen nutzen Tiere auch Pheromone, die der intraspezifischen Kommunikation dienen. KARLSON und LÜSCHER definierten den Begriff Pheromon erstmals 1959 als: *„Substanzen, die von einem Individuum nach außen abgegeben werden und bei einem Individuum der gleichen Art spezifische Reaktionen auslöst.“*^[5] Je nach Wirkungsweise werden Pheromone in zwei Gruppen, „Releaser“ und „Primer“,

unterteilt. Während Releaser-Pheromone das Verhalten des Empfängers beeinflussen, erzeugen Primer-Pheromone physiologische Veränderungen beim Empfänger. Außerdem können die Pheromone je nach Funktion noch in weitere Unterklassen, wie Sexualpheromone, Aggregationspheromone, Alarmpheromone, Markierungspheromone, Eiablagepheromone und viele Weitere eingeordnet werden.

Dabei zeigen die Pheromone eine sehr große strukturelle Vielfalt, nicht nur was die Substanzklassen angeht, sondern auch was das Molekulargewicht und die Flüchtigkeit betrifft. Bei den Amnioten, zu denen auch die Säugetiere zählen, reicht die Spanne des Molekulargewichts der Pheromone von 59.1 Da (Trimethylamin) bis zu 18893 Da (Darcin). Die Substanzklassen reichen von leicht flüchtigen Aldehyden über Aromaten und Heterozyklen bis hin zu Proteinen. Je nach Wirkungsweise können Pheromone sich nach kürzester Zeit verflüchtigt haben oder über Tage und Wochen hinweg bestehen bleiben.^[6]

Um Pheromone übertragen zu können, werden sie bei Säugetieren auf unterschiedliche Weise vom Körper abgegeben, zum Beispiel über den Atem, den Körpergeruch oder den Kot. Am häufigsten aber sind Pheromone Bestandteile von Körperflüssigkeiten wie zum Beispiel Speichel, Muttermilch, Drüsensekrete und Urin. Das erste identifizierte Säugetierpheromon war Androstenon (5 α -Androst-16-en-3-on) (**1**) in Eberspeichel (Abb. 1). 1968 isolierte PATTERSON das Pheromon aus dem Fett von Ebern und fand es außerdem in hohen Konzentrationen in deren Speicheldrüse des Unterkiefers.^[7,8] Später zeigten Verhaltensstudien, dass Androstenon aus dem Speichel des Ebers, wenn es von einer rauschigen Sau eingeatmet wird, die Duldungsstarre bei der Sau induziert.^[9]

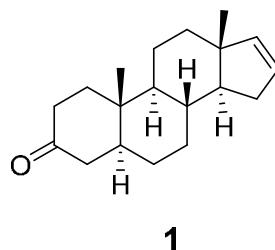


Abb. 1: Androstenon (**1**), das erste identifizierte Säugetierpheromon.

Pheromone sind aber nicht nur für die Fortpflanzung von Säugetieren wichtig, sondern auch für das Überleben des Nachwuchses. Weibliche Wildkaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) säugen ihren Nachwuchs nur 4-5 Minuten am Tag während der ersten zwei Wochen nach der Geburt. Für die Wildkaninchenbabys ist die Milchaufnahme in den ersten zwei Tagen überlebenswichtig. Aus diesem Grund gibt die Mutter das Pheromon (*E*)-2-Methylbut-2-enal (2MB2) (**2**) mit der Muttermilch und mit Sekreten rund um die Brustwarzen ab, die eine Suchen-Greifen-Reaktion bei den Babys auslöst (Abb. 2).^[10]

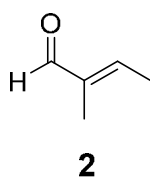


Abb. 2: Das Pheromon (*E*)-2-Methylbut-2-enal (2MB2) (**2**) aus der Muttermilch von Wildkaninchen.

Duftmarken sind für die Kommunikation von nachtaktiven, aber auch von vielen visuell orientierten Säugetieren von erheblicher Bedeutung.^[11] Großohr-Riesengalagos (*Galago crassicaudatus*) besitzen eine auffällige Brustdrüse, deren Sekrete zur Duftmarkierung an Oberflächen wie z.B. Äste gerieben werden. Die Analyse der Sekrete ergab drei Hauptkomponenten: Phenylacetonitril (**3**), 4-(2-Hydroxyethyl)phenol (**4**) und (4-Hydroxyphenyl)acetonitril (**5**) (Abb. 3). Die Mischung dieser drei Verbindungen führt bei Galagos zu einem intensiven Schnüffeln, gefolgt von einer eigentümlichen Zurschaustellung. Dabei prüfen die Galagos ihre Umgebung. Anschließend schnüffeln sie wieder an der Duftmarke. Die einzelnen Verbindungen für sich genommen rufen keine Reaktion hervor. Eine besondere Bedeutung hat das Alter der Duftmarke. Erschnüppern Männchen eine frische Duftmarke eines anderen Männchens ziehen sie sich häufig auf demselben Weg zurück auf dem sie gekommen sind. Ist die Duftmarke älter als eine Stunde ist dieses Verhalten nicht zu beobachten. Dies liegt an der Verbindung Phenylacetonitril (**3**), die leicht flüchtig ist und innerhalb einer Stunde nur noch in einer geringfügigen Konzentration in der Duftmarke enthalten ist. Die anderen beiden Ver-

bindungen **4** und **5** sind dagegen schwerer flüchtig und noch nach einigen Tagen nachweisbar. Die Markierung mit Brustdrüsensekreten nutzen außerdem dominante Männchen als Warnung an andere Männchen, wenn sie Weibchen im Östrus folgen.^{[12],[13]}

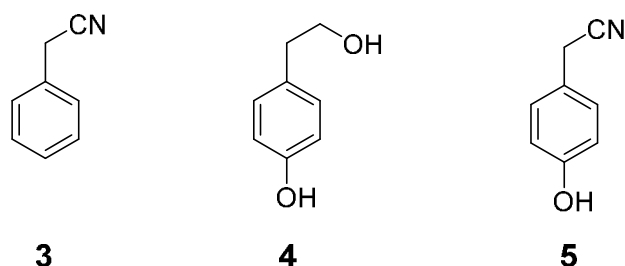


Abb. 3: Aktive Hauptkomponenten der Brustdrüsensekrete von Großohr-Riesengalagos.

Mäuse und Ratten sind die wohl am besten erforschtesten Säugetiere, da sie sehr beliebte Modelltiere sind. Daher sind viele Pheromone und deren Funktionen bei ihnen bekannt. Im Kot von weiblichen Ratten (*Rattus norvegicus*) im Östrus sind beispielsweise die Verbindungen Propansäure (**6**), 2-Methylpropansäure (**7**), Butansäure (**8**), 3-Methylbutansäure (**9**) und Pentansäure (**10**) (Abb. 4) in geringerer Konzentration enthalten als im Diöstrus oder bei den Männchen. Werden die Männchen einer Mischung dieser fünf Verbindungen ausgesetzt, lösen sie bei ihnen Erektionen aus. Die Reaktion auf den Kot der Weibchen im Östrus ist dieselbe wie auf die Mischung der Verbindungen. Dabei zeigen die Männchen eine invertierte U-förmige Dosis-Antwort-Kurve auf die Konzentration der Verbindungen im Kot. Je höher die Konzentration der Verbindungen, desto geringer die Anzahl an Erektionen. Sinkt jedoch die Konzentration der Verbindungen, werden die Männchen deutlich erregter und die Anzahl an Erektionen steigt. Anhand der Verbindungen und deren Konzentration im Kot können die Männchen wahrscheinlich die fruchtbaren Weibchen erkennen.^[14] Umgekehrt identifizierte TAKÁCS *et al.* in der Analyse von mit Urin und Kot beschmutztem Einstreu von männlichen Ratten sechs Verbindungen, 2-Heptanon (**11**), 4-Heptanon (**12**), 3-Ethyl-2-heptanon (**13**), 2-Octanon (**14**), 2-Nonanon (**15**) und 4-Nonanon (**16**), die attraktiv auf Weibchen und abstoßend auf andere Männchen wirken (Abb. 4).^[15]

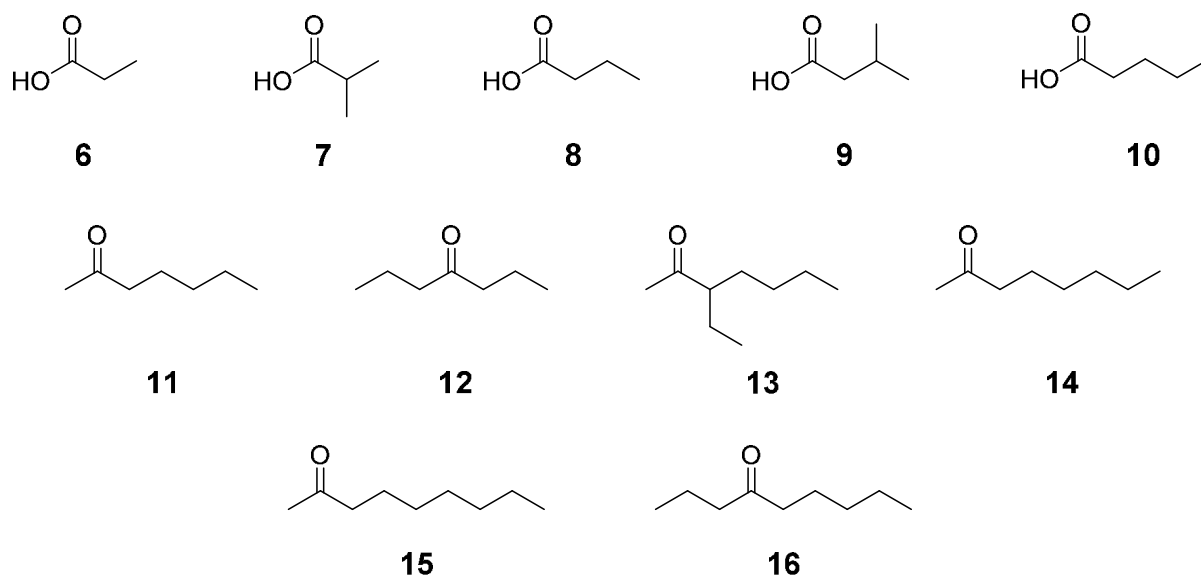


Abb. 4: Pheromone von weiblichen (**6-10**) und männlichen (**11-16**) Ratten.

Säugetiere nutzen extrem komplexe Kommunikationssysteme und -wege um Informationen weiterzugeben. Die entscheidenden Pheromone sind immer in einer komplexen Matrix aus vielen sehr unterschiedlichen Verbindungen eingebettet. Aus diesem Grund ist es häufig sehr schwierig die betreffenden Verbindungen als Pheromone zu isolieren, identifizieren und die Bioaktivität zu bestätigen. Ein erfolgreiches Beispiel ist die Isolierung und Identifizierung von (*Z*)-7-Dodecen-1-ylacetat (**17**) als Sexpheromon aus dem Urin von weiblichen Asiatischen Elefanten (*Elephas maximus*) (Abb. 5). Bei den Männchen löst dieses Pheromon verschiedene chemosensorische Antworten wie Flehmen, Erregung und Paarungsverhalten aus.

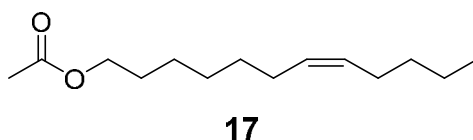


Abb. 5: Das Sexpheromon, (*Z*)-7-Dodecen-1-ylacetat (**17**), der weiblichen Elefanten.

Männliche und weibliche Elefanten leben getrennt voneinander. Die Weibchen bilden mit ihrem Nachwuchs zusammen feste Familieneinheiten, während die Männchen entweder alleine oder in losen Gruppen umherziehen. Um den Männchen ihre Paarungsbereitschaft über die räumliche Trennung hinweg signalisieren zu können, geben die Weibchen über den Urin das Pheromon (Z)-7-Dodecen-1-ylacetat (**17**) ab. Während der Lutealphase ist das Pheromon im Urin nicht nachweisbar. Erst in der frühen Follikelphase steigt die Konzentration auf 0.48 µg/mL (0.002mM) an und erreicht mit 33.0 µg/mL (0.146 mM) ihren Höhepunkt kurz vor der Ovulation.^[16] In diesem Zeitraum steigt nicht nur die Konzentration des Pheromons, sondern es erhöht sich auch der pH-Wert des Urins auf 8.4, sowie der Anteil von einigen Urinproteinen. Bei diesem leicht alkalischen pH-Wert ist das hydrophobe (Z)-7-Dodecen-1-ylacetat (**17**) im Urin an ein 66-kDa Protein gebunden. Dieses besitzt eine N-terminale Sequenz mit hoher Ähnlichkeit zu anderen Albuminen. Dieses sogenannte Elefantenalbumin (EA) bindet das Pheromon, damit es sich nicht zu schnell aus dem Urin verflüchtigt.^[17]

In der freien Natur erschnupern die Männchen die Weibchen zunächst aus der Ferne, bevor sie direkten Kontakt aufnehmen. Dabei tauchen sie ihre Rüsselspitze in den weiblichen Urin oder breiten das komplette Ende des Rüssels über dem Urin aus und inhalieren. Währenddessen tropft Schleim aus der Rüsselspitze. Dieser saure Schleim wird in den proximalen Rüsselepithelien produziert und enthält hohe Anteile an wasserlöslichen Proteinen. Trifft der Rüsselschleim nun auf den Pheromon-Protein-Komplex wird unter den sauren Bedingungen **17** freigesetzt.^[17] In der freien Form transportiert der Rüssel es zum Riechepithel. Gleichzeitig wird zusätzlich noch das Flehmenverhalten beim Männchen ausgelöst, dabei wird der Rüssel angehoben und die Rüsselspitze mit der Urin-/Schleim-Mischung in das Maul an die vomeronasal Organ Kanalöffnungen herangeführt. In den Kanälen zum vomeronasal Organ wird das Pheromon wiederum an ein 60-kDa Protein gebunden, das es zu den sensorischen Neuronen des vomeronasal Organs transportiert.^[17]

Im Allgemeinen besitzen Säugetiere drei Hauptsinnessysteme zur Detektion von chemischen Verbindungen. Dazu gehören der Geruchssinn (MOS), das vomeronasal System, das aber nicht bei allen Säugetieren funktionsfähig ist, und der Geschmackssinn. Es ist bisher aber nicht bekannt, dass Pheromone über den Geschmackssinn wahrgenommen werden.^[6]

Beim Geruchssinn gelangen durch das Einatmen die chemischen Signalmoleküle über den Luftstrom in die Nasenhöhle. Dort befinden sich drei Nasenmuscheln (*Conchae nasales*), die den Luftstrom leiten. Von dort aus gelangen die Moleküle zur Riechschleimhaut oder Riechepithel (*Regio olfactoria*), die oberhalb der oberen Nasenmuschel liegt. Sie besteht aus vielen Millionen Sinneszellen. Aus jeder dieser Zellen ragen 5-20 Härchen, die sogenannten Cilien mit speziellen Geruchsrezeptoren in die Schleimhaut hinaus (Abb. 6). Während ein Mensch etwa 400 verschiedene Rezeptoren besitzt, verfügen Hunde und Ratten beispielsweise über 1000. Jede dieser Sinneszelle bildet dabei nur einen einzigen Rezeptortyp aus. Wird nun ein Signalmolekül in der Schleimhaut gelöst, kommt es zur Anlagerung des Moleküls an ein Rezeptorprotein (G-Protein), wodurch eine Art Schlüssel-Schloss-Reaktion stattfindet. Daraufhin wird eine elektro-chemische Kaskade ausgelöst. Diese elektrischen Impulse werden von integrierenden Nervenfasern zusammengefasst und zum Riechhirn (*Bulbus olfactorius*) weitergeleitet. Von dort aus verlaufen Nervenstränge (Axone) in verschiedene Großhirnregionen.^{[18],[19]}

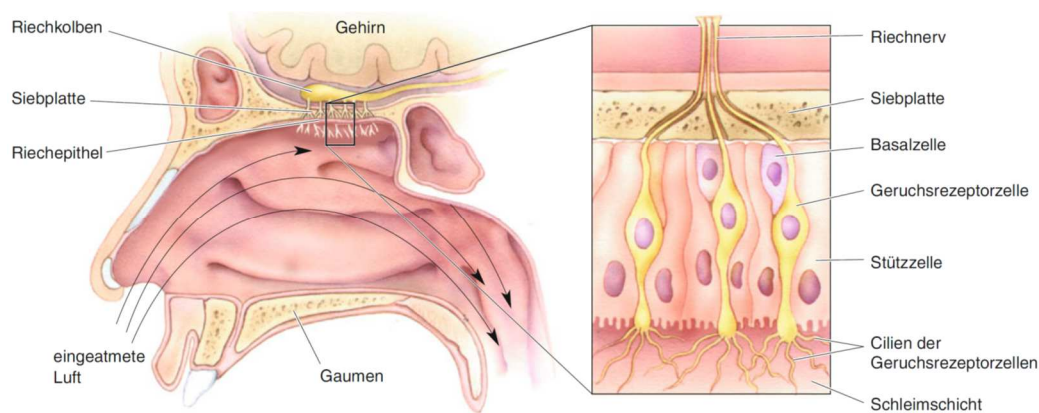


Abb. 6: Lage und Struktur des Riechepithels.^[19]

Das zweite System zur Detektion von Signalmolekülen ist das vomeronasal Organ (VNO), auch Jacobson Organ genannt. Es ist hauptsächlich auf die olfaktorische Wahrnehmung von Pheromonen, Geruch- und Geschmacksstoffen spezialisiert. Das paarige, schlauchförmige Organ befindet sich bei Säugetieren an der Basis des nasalen Septums, nahe der Schneidezähne, beiderseits der Nasenscheidewand. Jede

Seite hat ein mondförmiges Lumen. Das flüssigkeitsgefüllte VNO ist in einer Knorpelkapsel eingebettet und mündet durch einen Kanal (Stensonscher Gang) entweder in der Nasenhöhle (Nagetiere) oder in dem Nasengaumengang (*Ductus nasoplatinus*) und hat so Zugang zur Außenwelt (Abb. 7). Speichel, Urin und andere Flüssigkeiten werden in den Kanal des VNO eingezogen und anschließend wieder hinausgepresst. Dies geschieht über einen Pumpmechanismus, der durch An- und Abschwellen der umgebenden großen Blutgefäße und sowie Kontraktion der Muskeln gesteuert wird.^{[18],[20]} Handelt es sich beispielsweise um eingetrocknete Duftmarke wird sie mit Mund- oder Nasenflüssigkeit angefeuchtet und dann anschließend inhaliert. Die Sinneszellen des VNO sind wie in der Riechschleimhaut (*Regio olfactoria*) zugleich chemosensorische Nervenzellen (primäre Sinneszellen) und bilden auf Erregung hin Aktionspotentiale. Im Gegensatz zu den Rezeptorzellen der olfaktorischen sensorischen Neuronen der Riechschleimhaut (*Regio olfactoria*) sind die des VNO nicht mit Cilien sondern mit Microvilli bedeckt. Auf den Microvilli sind die sensorischen Rezeptoren lokalisiert, die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Bisher wurden zwei verschiedene G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im VNO identifiziert, jeder in einer bestimmten Region: V1R und V2R. Beide gehören zu der Gruppe der siebenfach membran-durchspannenden (hetahelikalen) Rezeptoren. An den V1 Rezeptoren (V1R) koppelt das G-Protein Gai2. V1R ist besonders im VNO von Mäusen exprimiert und reagieren empfindlich auf kleine, flüchtige Duftmoleküle. An den V2 Rezeptoren (V2R) koppelt indes das G-Protein Gao. Diese Rezeptoren sind auf längere Peptidketten spezialisiert.^{[20],[21]}

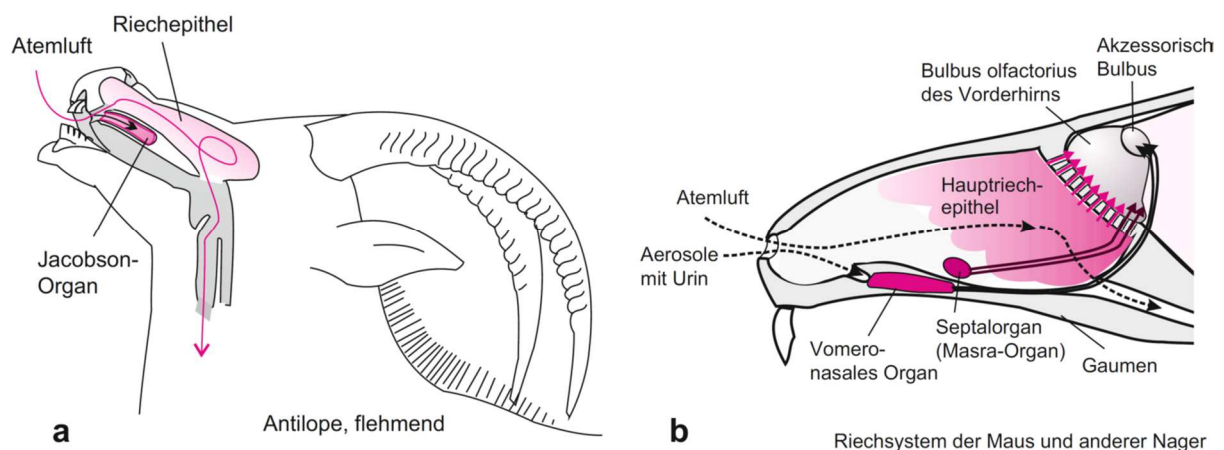


Abb. 7: Vomeronasal Organ bei Säugetieren (a) und bei Nagetieren (b).^[20]

Im Gegensatz zu den Rezeptorzellen der Riechschleimhaut, welche die neuronalen Signale an den olfaktorischen Kortex senden, leiten die Rezeptorzellen des VNO ihre Signale an den *Bulbus olfactorius accessorius* und über die Amygdala weiter bis in den Hypothalamus. Dieser ist ein endokrines Hauptzentrum und unter anderem für die Abgabe von Hormonen zuständig, die zum Beispiel auch das Paarungsverhalten steuern.^[20]

Direkt assoziiert mit dem vomeronasal Organ ist das sogenannte Flehmenverhalten. Dieses angeborene, instinktive Verhalten tritt bei Tieren, wie zum Beispiel Katzen, Elefanten, Pferden, Tigern, Tapire und Mäusen auf. Aber nicht alle Tiere, die ein vomeronasal Organ besitzen, flehmen auch. Die Tiere schnuppen zunächst intensiv an einer besonders interessanten Geruchsquelle wie Urin oder Duftmarken. Anschließend nehmen sie über die Schnauze oder Zunge Kontakt mit der Geruchsquelle auf, um die Signalmoleküle absorbieren zu können. Beim darauffolgenden Flehmen heben sie ihren Kopf, öffnen leicht ihr Maul, ziehen die Oberlippe zurück und strecken die Zungenspitze hinaus oder bewegen sie rhythmisch gegen das Mundhöhlendach (Abb. 8). Diese Haltung wird für einige Sekunden beibehalten. Die genaue Funktion des Flehmenverhaltens ist bis heute nicht komplett geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass dieses Verhalten dem Transport von Pheromonen und anderen Molekülen zum vomeronasal Organ dient.^{[18],[20]}



Abb. 8: Flehmende Katze. [Foto: Dr. Insa Bergmann]

Im Gegensatz zu der Annahme, dass nur das VNO Pheromone detektiert, nimmt auch der normale Geruchssinn (MOS) mit der Riechschleimhaut Pheromone wahr. Umge-

kehrt detektiert das VNO nicht nur Pheromone, sondern auch Verbindungen ohne bekannte Signalfunktion. Der MOS nimmt hauptsächlich flüchtige Verbindungen wahr, während das VNO auf schwerer flüchtige Verbindungen reagiert.^[6]

2 Themenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten chemische Signale von Hauskatzen und Mausmakis untersucht werden. Dazu sollten die flüchtigen Substanzen aus dem Urin dieser Tiere identifiziert werden.

Im ersten Teil der Arbeit sollte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von MIYAZAKI von der Iwate Universität in Japan flehmeninduzierende Substanzen von Hauskatzen untersucht werden. Diese Arbeitsgruppe hatte gezeigt, dass die Fettsäuren als Bestandteile des Urins den Effekt auslösen. Diese Fettsäuren erwiesen sich als komplex zusammengesetztes Bouquet von Verbindungen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Strukturen dieser Verbindungen aufgeklärt werden und ausgewählte Vertreter synthetisiert werden, um sie für Biotests in Japan zur Verfügung zu stellen. Wenn möglich sollte auch die absolute Konfiguration der Zielverbindungen geklärt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit ging es um die systematische Analyse flüchtiger Verbindungen des Urins zweier Mausmakiarten, *Microcebus murinus* und *Microcebus lehilahyt-sara*. Dafür sollte zunächst eine effektive Extraktionsmethode für den Urin entwickelt werden. In Kooperation mit Prof. RADESPIEL von der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover wurden 22 Urinproben bereitgestellt, die systematisch zu untersuchen waren. Mögliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Verbindungen in dem Urin von männlichen und weiblichen Mausmakis und der beiden Arten waren aufzufinden. Damit sollte die Grundlage für die Untersuchung chemischer Signaturen von Mausmakis geschaffen werden, um darauf aufbauend Studien zu ermöglichen.

3 Identifizierung und Synthese von Fettsäuren aus flehmeninduzierenden Urinextrakten von Hauskatzen

3.1 Einleitung

„Katzen sind geheimnisvoll. In ihnen geht mehr vor als wir gewahr werden.“

(Sir Walter Scott)

Obwohl Katzen den Menschen schon seit tausenden von Jahren begleiten, wissen wir immer noch erstaunlich wenig über die Kommunikation der Katzen. Bis jetzt ist relativ wenig über das Bewusstsein und die chemische Kommunikation der Katzen bekannt, obwohl sie eine wesentliche Rolle für Katzen und ihre sozialen Beziehungen spielt. Dies lässt sich sehr gut an dem ausgeprägten Markierungsverhalten belegen. Mit Hilfe von Drüsensekreten, Kot und Urin markieren Katzen ihre Umgebung und teilen Artgenossen unter anderem ihr Alter, Geschlecht, Identität, den sozialen und sexuellen Status, ihre Gesundheit und ihre Bewegungshistorie mit.

Raubtiere besitzen die am besten ausgebildeten und differenziertesten Typen an pheromonabsetzenden Drüsen überhaupt.^{[22],[23]} Bei den Katzen befinden sich Drüsen um den Mund herum, am Kinn, der Stirn, den Wangen, am unteren Rücken, den Pfoten und dem perianal Bereich. Zum Markieren reiben sie sich mit den betreffenden Drüsen gegen bevorzugt eckige Objekte oder auch andere Artgenossen. Kommt eine weitere Katze an dieser Geruchsmarkierung vorbei, schnüffelt sie intensiv an der markierten Stelle und reibt sich sehr wahrscheinlich auch daran. Dieser Vorgang kann sich mehrmals bei derselben Katze wiederholen. Schon von anderen Katzen markierte Objekte sind für andere Katzen interessanter als unmarkierte.^[24] Wozu diese Markierungen dienen und welche Substanzen dafür verantwortlich sind, ist bisher nur von den Talgdrüsen der Wangen, sowie von den Analsacksekreten der Katzen bekannt. Fünf unterschiedliche Pheromone (F1 – F5) konnten von den Talgdrüsen an den Wangen der Katzen isoliert und identifiziert werden (Tab. 1).^{[23],[25]} Dabei handelt es sich um Mischungen aus verschiedenen Fettsäuren und in zwei Fällen um Trimethylamin. Die Funktion dieser Pheromone ist nur bei drei der fünf Pheromone aufgeklärt. Das

F2 Pheromon wird von männlichen Katzen im sexuellen Kontext in der Nähe von sexuell aktiven Weibchen abgegeben und soll wahrscheinlich der männlichen sexuellen Zurschaustellung dienen.^{[23],[26]} Beim Reiben an Objekten wird häufig das F3 Pheromon abgegeben. Dies dient möglicherweise der Orientierung und der Unterscheidung von bekannten und unbekannten Plätzen.^{[23],[26]} Das F4 Pheromon wird auch das allomarking Pheromon genannt. Allomarking Verhalten wird bei Katzen beobachtet, die zusammen mit anderen Katzen, Hunden oder Menschen leben. Sie markieren die anderen, um eine Vertraulichkeit zu assoziieren, so dass die Wahrscheinlichkeit von aggressivem Verhalten gegenüber diesem Individuum vermindert wird.^{[23],[27]} Die Funktion der Pheromone F1 und F5 ist bisher noch unbekannt, genauso der Mechanismus, welcher steuert wann welches Pheromon abgegeben wird.^[23]

Tab. 1: Chemische Zusammensetzung der Pheromone F1 bis F5, isoliert von den Talgdrüsen an den Wangen von Katzen.^{[25],[28]}

Pheromon	Verbindungen
F1	9-Octadecensäure, Hexansäure, 5-Aminopentansäure, Butansäure, 2-Methylbutansäure, Trimethylamin
F2	9-Octadecensäure, Hexadecensäure, Propansäure, (4-Hydroxyphenyl)essigsäure
F3	9-Octadecensäure, Hexadecensäure, Heptandisäure
F4	9-Octadecensäure, Heptandisäure, Butansäure, 5 α -Cholestan-3 β -ol
F5	Hexadecensäure, 5-Aminopentansäure, 2-Methylbutansäure, Butansäure, 2-Methylpropansäure, (4-Hydroxyphenyl)essigsäure, Nonandisäure, Trimethylamin

Katzen besitzen genauso wie die meisten anderen Raubtiere ein Paar Analsäcke. Innerhalb der ventrolateralen perianal Region sind diese mit zwei Drüsenarten überzogen, Talgdrüsen und apokrine Drüsen.^{[29],[30]} Die Analsäcke geben ein stark riechendes Sekret ab. MIYAZAKI *et al.* klärten mit Headspace Untersuchungen und Verhaltenstests die Funktion auf.^[31] Die GC/MS Untersuchungen der Gasphase zeigten, dass die flüchtigen Hauptkomponenten des Sekrets kurzkettige Fettsäuren, wie Essigsäure, Propansäure, 2-Methylpropansäure, Butansäure, 3-Methylbutansäure und Pentansäure enthielt. Trimethylamin und Indol traten als Nebenverbindungen auf. Eine statistische

Hauptkomponenten- und Clusteranalyse zeigte, dass die Variationen der zehn freien Fettsäuren tatsächlich individuelle Unterschiede und keine Geschlechterunterschiede waren. Habituation-Dishabituation-Tests zeigten, dass Katzen zwischen den individuellen Sekretgerüchen von zwei Tieren unterscheiden können. Jede Katze scheint somit ihr eigenes individuelles chemisches Duftprofil zu besitzen, anhand dessen Andere sie erkennen können.^[31]

Neben Drüsensekreten nutzen Katzen auch Kot zur Geruchsmarkierung, um mit anderen zu kommunizieren.^[32] Obwohl Katzen normalerweise ihren Kot verscharren wenn sie in ihrem Aktionsraum oder in der Nähe ihrer Nistplätze sind, lassen sie den Kot am Rande ihrer Territorien unverscharrt. Dies geschieht wahrscheinlich um ihr Revier zu markieren.^[33] Bisher war bekannt, dass Katzen zwischen bekannten und unbekannten Individuen unterscheiden können, jedoch nicht, welche fäkalen flüchtigen Verbindungen dafür verantwortlich sind.^[34] MIYAZAKI *et al.* fand nun heraus, dass die Konzentration an 3-Mercapto-3-methyl-1-butanol (MMB) (**18**), ein Abbauprodukt des Felinin (**19**)^[35], in männlichem Katzenkot deutlich höher ist als in weiblichen.^[36] Dafür analysierten sie die flüchtigen Verbindungen der Headspaceextrakte von Kot von Männchen und Weibchen und führte unterschiedliche Versuche durch, unter anderem ob Katzen zwischen MMB-haltigen Kot unterscheiden können. Der höhere Gehalt an MMB (**18**) in männlichem Kot ist auf die geschlechtsabhängige Biosynthese des Felinins (**19**) zurückzuführen.^{[37],[38]} Denn schon die Felinin (**19**) Precursor 3-Methylbutanol-glutathion (**20**) und 3-Methylbutanol-cysteinylglycin (**21**) sind in der Galle von Männchen in höherer Konzentration enthalten als in Weibchen (Abb. 9).^{[35],[36]} Zusätzlich können Weibchen schlechter zwischen MMB-haltigem und nicht-haltigem Kot unterscheiden. Der Grund dafür könnte das deutlich größere Territorium der männlichen Katzen sein. Diese Territorien überlappen häufiger als bei Weibchen.^[39] Somit könnte das MMB (**18**) in dem Kot der Männchen als männliches Geschlechtserkennungspheomon dienen, um mögliche Konflikte mit anderen männlichen Katzen in demselben Territorium zu vermeiden. Außerdem verflüchtigt sich MMB (**18**) mit der Zeit, was die Katzen möglicherweise als Zeitvorhersage nutzen, um abzuschätzen, wann der Vorgänger das Gelände verlassen hat und ob es sicher ist dieses Territorium zu betreten.^[36]

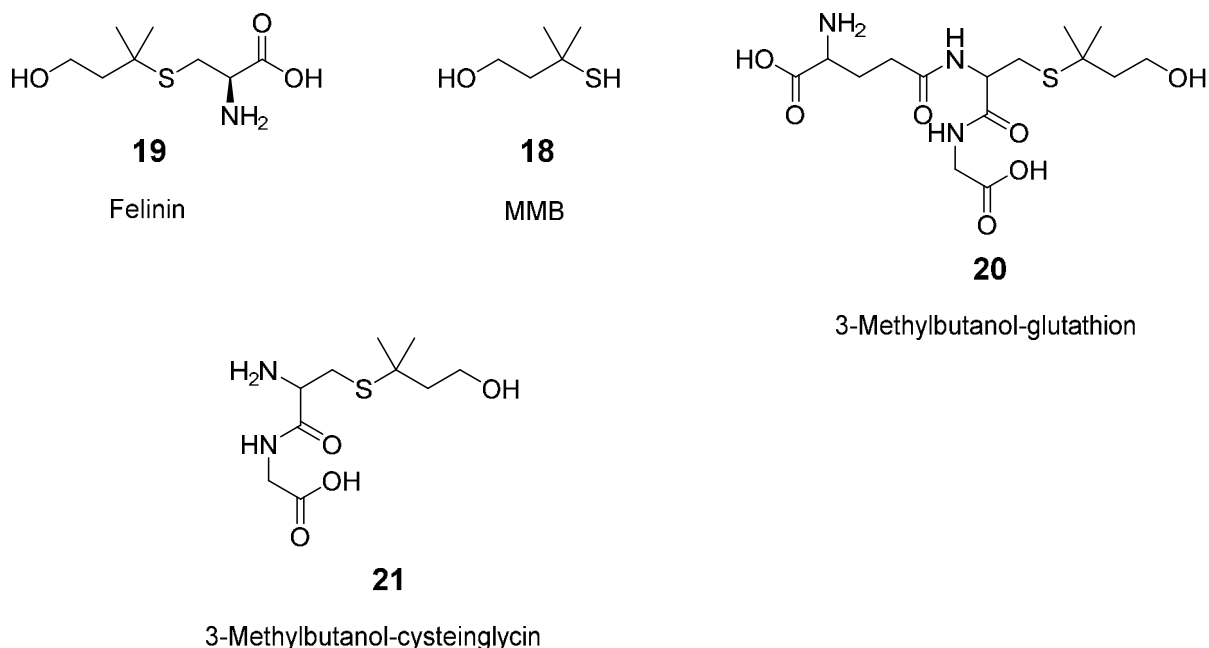


Abb. 9: Strukturen der Verbindungen Felinin (**19**), 3-Mercapto-3-methyl-1-butanol (MMB) (**18**), 3-Methylbutanol-glutathion (**20**), 3-Methylbutanol-cysteinglycin (**21**).

Die anderen Hauptkomponenten der Headspaceextrakte vom Kot waren vor allem kurzkettige Fettsäuren wie Butansäure und Pentansäure. Habituation-Dishabituation-Tests zeigten, dass Katzen zwischen den Kotgerüchen von zwei Tieren unterscheiden können. Wie schon bei den Analsacksekreten dienen individuelle Fettsäurezusammensetzungen im Kot der Identifikation einzelner Tiere.^[36]

Katzen nutzen neben Sekreten und Kot auch Urin zur Duftmarkierung sowie zur Reviermarkierung.^{[40],[41]} Vor allem Männchen, aber auch Östrus-Weibchen sprühen dafür mit nach oben gerichteten Schwanz eine kleine Menge Urin an vertikale Oberflächen wie Wände oder Baumstümpfe (Abb. 10).^{[32],[42]} Kommt eine andere Katze an einer Urinmarkierung vorbei schnüffelt sie intensiv und flehmt wahrscheinlich anschließend. Beim Flehmen heben die Katzen ihren Kopf, öffnen leicht ihr Maul, ziehen die Oberlippe zurück und bewegen die Zunge rhythmisch gegen das Mundhöhlendach (Abb. 12). Dabei flehmen Männchen häufiger als Weibchen.^[24] Im Gegensatz zu Hunden markieren Katzen andere Duftmarken nicht über.^[43]



Abb. 10: Zur Duftmarkierung sprühen Katzen ihren Urin an vertikale Oberflächen.^[23]

Welche Informationen im Urin verborgen sind, ist bislang nicht vollständig erforscht. Es wird aber davon ausgegangen, dass Spezies, Geschlecht, Identität, sozialer und sexueller Status mit dem Urin vermittelt werden.^[35] Verhaltenstests haben gezeigt, dass Katzen zwischen unterschiedlich alten Urinmarkierungen unterscheiden können und diese wahrscheinlich nutzen, um abzuschätzen wann sie ein Territorium ohne Bedenken betreten können. Dabei zeigten sie ein größeres Interesse an frischen Urinmarkierungen als an älteren.^[44] Bekannt ist außerdem, wo der typisch katzenartige Geruch des Urins seinen Ursprung hat. Katzenurin enthält eine große Menge der nicht-proteinogenen Aminosäure Felinin ((*R*)-2-Amino-3-[(3-hydroxy-1,1-dimethylpropyl)thio]propansäure) (**19**)^{[45],[46]}, wobei die Produktionsmenge wie beim Kot geschlechterabhängig ist. Männchen produzieren deutlich mehr Felinin (**19**) als Weibchen, da die Produktion durch Testosteron gesteuert wird.^{[37],[45]} Die Aminosäure wurde bisher nur in den kleinen Katzenarten, wie Rotluchsen (*Lynx rufus*) und Luchsen (*Eurasian lynx*) gefunden.^{[46],[47]} Das geruchslose Felinin (**19**) wird von einer bakteriellen Lyase zu dem flüchtigen 3-Mercapto-3-methyl-1-butanol (MMB) (**18**) abgebaut, das den charakteristischen Schwefelgeruch besitzt. Zusätzlich werden die Verbindungen 3-Methyl-3-sulfanylbutyl-acetat (**22**) und 3-Methyl-3-methylsulfanyl-1-butanol (**23**) freigesetzt.^{[35],[47]}

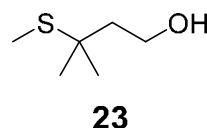
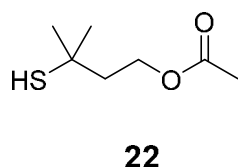


Abb. 11: Strukturen der Verbindungen 3-Methyl-3-sulfanylbutyl-acetat (**22**) und 3-Methyl-3-methylsulfanyl-1-butanol (**23**).

In Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe wollte die Gruppe um MIYAZAKI herausfinden, welche Schlüsselverbindungen aus dem Urin zur Kommunikation zwischen Katzen verwendet werden und welche Funktion sie besitzen. Dabei fokussierte er sich auf das Flehmenverhalten (Abb. 12). Dies tritt immer auf, wenn Männchen am Urin von Weibchen im Östrus schnuppern oder auch am Urin von anderen Männchen. Aber es tritt nicht auf, wenn sie an ihrem eigenen Urin riechen. Aus diesem Grund ist das Flehmenverhalten sehr gut geeignet, um herauszufinden, welche Verbindungen im Urin für die individuelle Identität bei Katzen verantwortlich sind.



Abb. 12: Eine Katze schnuppert intensiv am Urin einer anderen männlichen Katze (A) und zeigt anschließend das Flehmenverhalten (B). [Fotos: M. MIYAZAKI]

Dafür wurde der Urin von Männchen extrahiert und die organische Lipidphase säulenchromatographisch gereinigt und fraktioniert. Anschließend erfolgten weitere Fraktionierungen mittels HPLC. Die zum Schluss erhaltenen zwei flehmenaktiven Fraktionen sollten dann im Rahmen dieser Arbeit mittels GC/MS analysiert, Strukturvorschläge für unbekannte Fettsäuren erarbeitet und mittels Synthese bestätigt werden. Die synthetisierten Fettsäuren sollten anschließend in Japan auf ihre Bioaktivität hin überprüft

werden. Vorarbeiten hierzu wurden schon in der vorangegangenen Masterarbeit geleistet. Dabei wurden auch zwei flehmenaktive Fraktionen von männlichem Urin mittels GC/MS analysiert und Strukturvorschläge für unbekannte Fettsäuren erstellt. Erste Synthesen zur Strukturaufklärung wurden außerdem durchgeführt.^[48]

3.2 Analyse der Urinextrakte

Von der Arbeitsgruppe MIYAZAKI wurden zwei Fraktionen, im Folgenden Fraktion 1A und 1B genannt, zur Verfügung gestellt. Beide waren flehmenaktiv. Die Fraktionen wurden zunächst mit Hilfe von Diazomethan zu den entsprechenden Methylestern derivatisiert. Dies war notwendig, um die Fettsäuren aus den aktiven Fraktionen mittels GC/MS analysieren zu können, da Säuren für die unpolare HP-5ms Säule zu polar waren, was zu starkem Tailing und Peaküberlappung führte. Da eine Vielzahl von Säuren vorlag, konnte keine ausreichende Trennung ohne Derivatisierung erreicht werden. Die Ergebnisse der GC/MS Auswertung werden im Folgenden beschrieben.

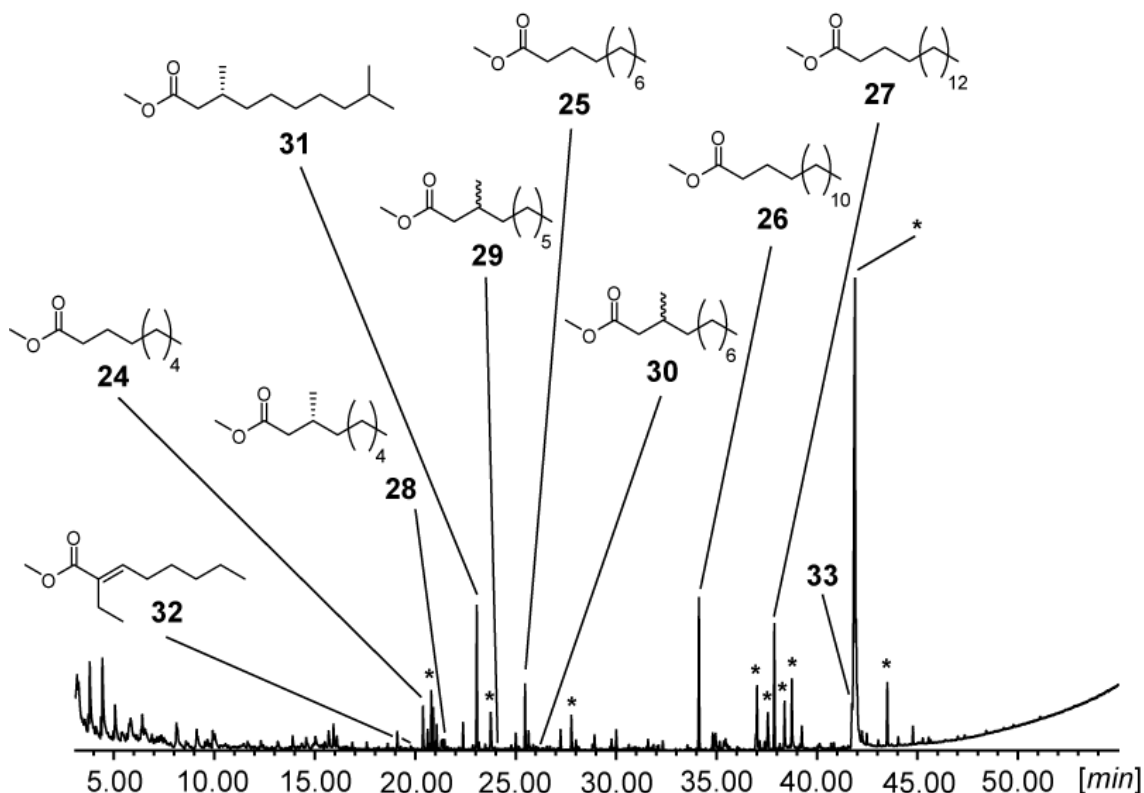


Abb. 13: Totalionenstromchromatogramm der flehmenaktiven Fraktion 1A. Artefakte sind mit * gekennzeichnet.

Tab. 2: Verbindungen der flehmenaktiven Fraktion 1A.

Verbindung^[a]	RT [min]	R_I^[b]	R_I [Lit.]^[c]	Konzentration^[d]
Gesättigte unverzweigte Fettsäuremethylester				
Hexansäuremethylester	7.68	923	924	x
Octansäuremethylester (34)	14.57	1124	1128	xx
Nonansäuremethylester	17.59	1223	1224	x
Decansäuremethylester (24)	20.39	1324	1326	xxx
Dodecansäuremethylester (25)	25.47	1523	1523	xxx
Tridecansäuremethylester	27.79	1622	1626	x
Tetradecansäuremethylester (35)	30.01	1723	1726	xx
Pentadecansäuremethylester	32.11	1823	1824	x
Hexadecansäuremethylester (26)	34.12	1923	1926	xxx
Heptadecansäuremethylester (68)	36.04	2023	2021	x
Octadecansäuremethylester (27)	37.87	2125	2128	xxx
Nonadecansäuremethylester (69)	39.63	2225	2221	x
Eicosansäuremethylester (70)	41.31	2326	2332	x
α-Methylverzweigte Fettsäuremethylester				
2-Methyldecansäuremethylester	21.33	1359	1357	x
β-Methylverzweigte Fettsäuremethylester				
(<i>R</i>)-3-Methyldecansäuremethylester (28) ^[e]	21.46	1364	1363	x
3-Methylundecansäuremethylester (29) ^[e]	23.97	1462	1463	x
3-Methyldodecansäuremethylester (30) ^[e]	26.37	1561	1563	x
ω-1 Methylverzweigte Fettsäuremethylester				
10-Methylundecansäuremethylester	24.59	1487	1484	x
11-Methyldodecansäuremethylester	26.96	1586	1584	x
12-Methyltridecansäuremethylester	29.21	1686	1683	x
13-Methyltetradecansäuremethylester	31.35	1786	1784	x
14-Methylpentadecansäuremethylester (71)	33.39	1886	1883	x
ω-2 Methylverzweigte Fettsäuremethylester				
10-Methyldodecansäuremethylester	27.12	1593	1591	x
12-Methylteradecansäuremethylester	31.51	1794	1791	x
14-Methylhexadecansäuremethylester	35.50	1994		x
β- und ω-1 Dimethylverzweigte Fettsäuremethylester				
3,8-Dimethylnonansäuremethylester ^{Δ}	20.48	1327		x
(<i>R</i>)-3,9-Dimethyldecansäuremethylester (31) ^[e]	23.07	1426	1426	xxx
α-Ethylverzweigte Fettsäuremethylester				
(<i>E</i>)-2-Ethyl-2-octensäuremethylester (32) ^[e]	19.82	1302	1302	x
Weitere Fettsäureester und Fettsäuren				
Hexandisäuredimethylester	18.17	1244		x
4,6-Dimethyloctansäuremethylester	18.88	1269		x

Unbekannter Fettsäureester M: 182 (43, 73, 127)	19.29	1283		x
Nonansäureethylester	19.63	1296	1294	x
Decansäureethylester	22.28	1395	1397	x
Octandisäuredimethylester	23.59	1447	1446	x
3-Methylundecansäureethylester ^Δ	24.77	1494		x
Nonandisäuredimethylester	26.03	1547	1548	x
Unbekannter Fettsäureester (88, 101, 69)	26.27	1557		x
Unbekannter Fettsäureester (95, 101, 152)	26.48	1566		x
Dodecansäureethylester	27.12	1592	1597	x
Dodecansäure-1-methylethylester	27.87	1626	1629	x
Tetradecansäureethylester	31.47	1792	1793	x
9-Hexadecensäuremethylester	33.62	1897		x
Hexadecansäureethylester	35.43	1991	1993	x
Hexadecansäure-1-methylethylester	36.02	2022	2023	x
9,12-Octadecadiensäuremethylester	37.28	2091		x
9-Octadecensäuremethylester	37.39	2098		x
11-Octadecensäuremethylester	37.51	2104		x
Octadecansäureethylester	39.06	2191	2193	x
Unbekannter Fettsäureester (67, 81, 95) (33)	41.74	2352		xxx

Weitere Verbindungen

1-Piperidincarboxaldehyd	14.89	1135	1140	x
1-Dodecen	16.62	1190	1192	x
Decanal (76)	17.02	1204	1203	x
Unbekannt M: 184 (73, 59, 129)	18.05	1240		x
3-Phenylbutansäuremethylester	20.01	1309		x
3-Phenylpentansäuremethylester	21.88	1380		x
1-Tetradecen	22.18	1391	1392	x
Unbekannt (43, 114, 146)	22.87	1418		x
4-Phenylpentansäuremethylester	22.95	1421		x
1-Dodecanol	24.23	1472	1473	x
Unbekannt M: 240 (69, 95, 83) (37)	26.90	1583		x
1-Hexadecanol (39)	33.19	1876	1879	x
Unbekannt (71, 57, 85)	38.08	2136		x
Dihydroisoprimarsäuremethylester	41.23	2321		x

[a] Artefakte sind nicht mit aufgeführt; bei unbekannten Verbindungen sind die größten Fragmentationen in Klammern angegeben

[b] Der Retentionsindex / wurde anhand der homologen Reihe der Alkane nach Van den Dool und Kratz bestimmt.

[c] Entnommen aus NIST Chemistry WebBook^[49].

[d] Relative Konzentration: x = 0-2%, xx = 2-5%, xxx = >5%.

[e] In dieser Arbeit synthetisierte Verbindung.

Δ Strukturvorschlag

In dem flehmenaktiven Urinextrakt 1A wurden insgesamt 63 Verbindungen identifiziert. Dabei handelte es sich zum Großteil um gesättigte, unverzweigte Fettsäuremethylester und methylverzweigte Fettsäuremethylester. Daneben fanden sich noch einige ungesättigte und ethylverzweigte Fettsäuremethylester. Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte durch Vergleich der Massenspektren und Retentionsindices mit Datenbank- und Literaturwerten. Die Hauptkomponenten waren Decansäuremethylester (**24**), (*R*)-3,9-Dimethyldecansäuremethylester (**31**), Dodecansäuremethylester (**25**), Hexadecansäuremethylester (**26**), Octadecansäuremethylester (**27**) und ein unbekannter Fettsäureester (**33**) (Abb. 14).

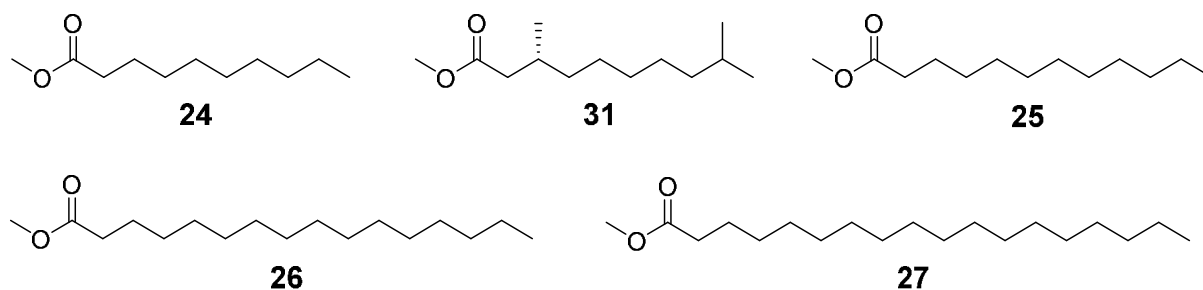


Abb. 14: Hauptkomponenten der flehmenaktiven Fraktion 1A nach Derivatisierung.

Fettsäuren sind weit verbreitete Verbindungen im Urin von Säugetieren. Ungewöhnlich hierbei war der (*R*)-3,9-Dimethyldecansäuremethylester (**31**), dessen Identifizierung durch Synthese abgesichert wurde. Dieser wurde in sehr hoher Konzentration in dem Urinextrakt gefunden und wurde bisher nur im ätherischen Öl von Geranium Bourbon (*Pelargonium* sp.) nachgewiesen.^[50] Diese Verbindung könnte eine mögliche Schlüsselverbindung sein, die das Flehmenverhalten auslöst. Zwei weitere gesättigte Fettsäuremethylester, Octansäuremethylester (**34**) und Tetradecansäuremethylester (**35**), kamen in mittlerer Konzentration in dem Extrakt vor (Abb. 15).

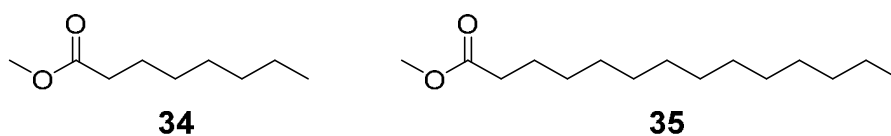


Abb. 15: Verbindungen mit mittlerer Konzentration der flehmenaktiven Fraktion 1A nach Derivatisierung.

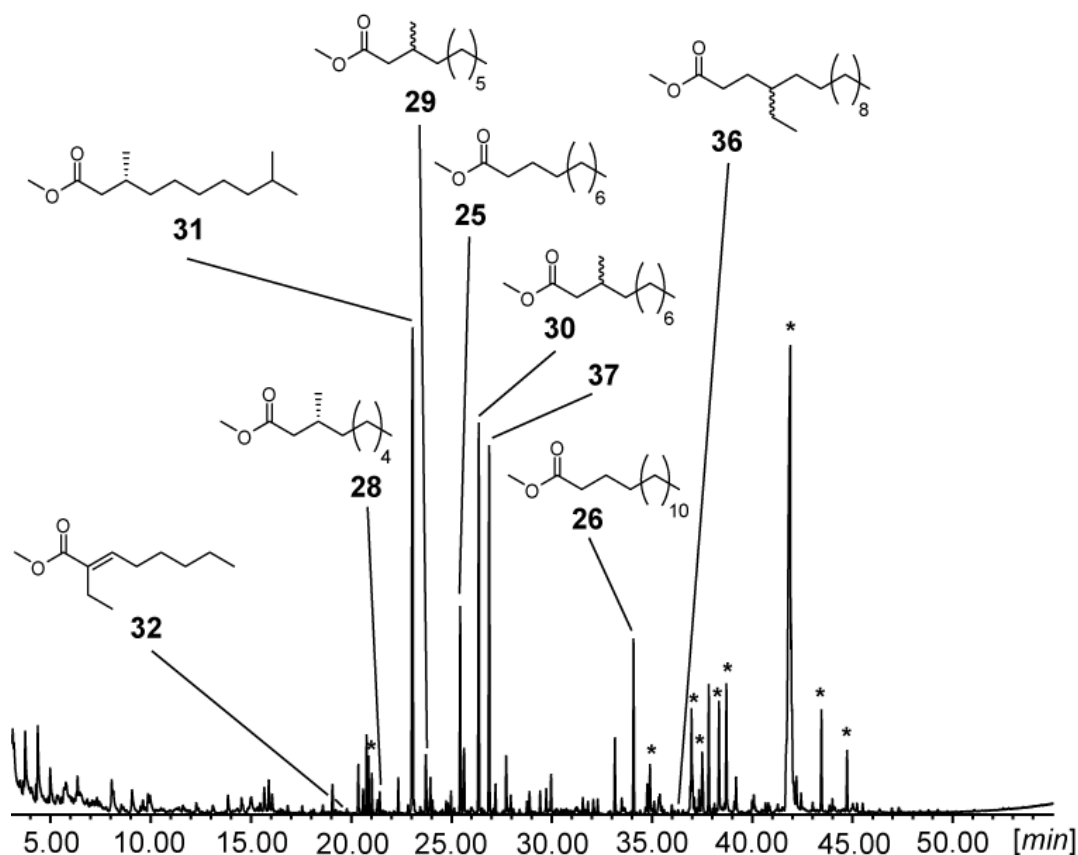


Abb. 16: Totalionenstromchromatogramm der flehmenaktiven Fraktion 1B. Artefakte sind mit * gekennzeichnet.

Tab. 3: Verbindungen der flehmenaktiven Fraktion 1B.

Verbindung ^[a]	RT [min]	RI ^[b]	RI [Lit.] ^[c]	Konzentration ^[d]
Gesättigte unverzweigte Fettsäuremethylester				
Octansäuremethylester (34)	14.53	1123	1128	x
Nonansäuremethylester	17.55	1222	1224	x
Decansäuremethylester (24)	20.35	1322	1326	x

Dodecansäuremethylester (25)	25.43	1522	1523	xxx
Tridecansäuremethylester	27.75	1620	1626	x
Tetradecansäuremethylester (35)	29.96	1720	1726	x
Pentadecansäuremethylester	32.07	1821	1824	x
Hexadecansäuremethylester (26)	34.08	1921	1926	xxx
Heptadecansäuremethylester (68)	35.99	2021	2021	x
Octadecansäuremethylester (27)	37.83	2122	2128	xx
Nonadecansäuremethylester (69)	39.58	2222	2221	x
Eicosansäuremethylester (70)	41.27	2323	2332	x
Docosansäuremethylester	44.46	2523	2530	x
Tricosansäuremethylester	45.96	2624	2631	x
Tetracosansäuremethylester	47.41	2725	2731	x
α-Methylverzweigte Fettsäuremethylester				
2-Methyl-2-decensäuremethylester (49)	20.40	1324		x
2-Methyldecansäuremethylester	21.29	1358	1357	x
2-Methylundecansäuremethylester	23.83	1456	1456	x
β-Methylverzweigte Fettsäuremethylester				
(R)-3-Methyldecansäuremethylester (28) ^[e]	21.42	1362	1363	x
3-Methylundecansäuremethylester (29) ^[e]	23.95	1461	1463	x
3-Methyldodecansäuremethylester (30) ^[e]	26.36	1561	1563	xxx
ω-1 Methylverzweigte Fettsäuremethylester				
9-Methyldecansäuremethylester	22.03	1385	1385	x
10-Methylundecansäuremethylester	24.54	1485	1484	x
11-Methyldodecansäuremethylester	26.92	1584	1584	x
12-Methyltridecansäuremethylester	29.17	1684	1683	x
13-Methyltetradecansäuremethylester	31.31	1784	1784	x
14-Methylpentadecansäuremethylester (71)	33.35	1884	1883	x
16-Methylheptadecansäuremethylester (55)	37.16	2085		x
ω-2 Methylverzweigte Fettsäuremethylester				
8-Methyldecansäuremethylester	22.20	1392	1392	x
10-Methyldodecansäuremethylester	27.11	1592	1591	x
12-Methyltetradecansäuremethylester	31.46	1792	1791	x
14-Methylhexadecansäuremethylester	35.45	1992		x
β- und ω-1 Dimethylverzweigte Fettsäuremethylester				
3,8-Dimethylnonansäuremethylester	20.55	1330		x
(R)-3,9-Dimethyldecansäuremethylester (31) ^[e]	23.06	1426	1426	xxx
3,10-Dimethylundecansäuremethylester (38)	25.63	1530		xx
α-Ethylverzweigte Fettsäuremethylester				
(E)-2-Ethyl-2-octensäuremethylester (32) ^[e]	19.78	1301	1302	x
2-Ethylundecensäuremethylester ^{Δ}	24.83	1497		x

Weitere Fettsäureester und Fettsäuren

Unbekannter Fettsäureester M: 184 (43, 59, 73)	17.99	1238		x
Hexandisäuredimethylester	18.12	1242		x
4,6-Dimethyloctansäuremethylester	18.85	1268		x
Unbekannter Fettsäureester M: 184 (141, 109, 81)	19.04	1275		x
Unbekannte Fettsäure (43, 73, 69)	19.24	1282		x
Decansäureethylester	22.24	1393	1397	x
Unbekannter Fettsäureester (101, 74, 69)	22.83	1416		x
Octandisäuredimethylester	23.53	1445	1446	x
Unbekannter Fettsäureester M: 212 (115, 43, 69)	23.92	1460		x
Unbekannter Fettsäureester M: 228 (101, 74, 43)	24.05	1465		x
3-Methyundecansäureethylester ^Δ	24.73	1493		x
Unbekannter Fettsäureester (74, 43, 57)	24.98	1503		x
Nonandisäuredimethylester	25.98	1545	1548	x
4-Methyldodecansäuremethylester	26.63	1572	1572	x
Dodecansäure-1-methylethylester	27.83	1624	1629	x
3-Methyldodecansäureethylester ^Δ	27.91	1627		x
Unbekannter Fettsäureester (58, 101, 118)	30.46	1744		x
9-Hexadecensäuremethylester	33.59	1896		x
Hexadecansäureethylester	35.39	1988	1993	x
4-Ethylhexadecansäuremethylester (36) ^[e]	36.54	2051	2055	x
9,12-Octadecadiensäuremethylester	37.23	2089	2092	x
9-Octadecensäuremethylester	37.34	2095		x
11-Octadecensäuremethylester	37.47	2102		x
Hexadecansäure-2-methylpropylester	38.15	2140	2135	x
Octadecansäureethylester	39.02	2189	2193	x
Hexadecansäure-2-hydroxyethylester	39.74	2231		x
Octadecansäure-10-oxomethylester	40.87	2299		x
Unbekannter Fettsäureester (67, 81, 95) (33)	41.70	2350		xx

Weitere Verbindungen

Limonen (127)	11.26	1024	1028	x
1-Piperidincarboxaldehyd	14.84	1133	1140	x
1-Dodecen	16.57	1189	1192	x
2-Decanon	16.60	1190	1194	x
Decanal (76)	16.98	1202	1203	x
Unbekannt (55, 43, 114)	19.23	1282		x
Unbekannt (135, 150, 79)	20.77	1338		x
4-Methoxybenzoesäuremethylester	21.65	1371	1376	x
1-Tetradecen	22.14	1389	1392	x
Dodecanal	22.56	1405	1407	x
Unbekannt (43, 114, 146)	22.84	1417		x
1-Dodecanol	24.19	1471	1473	x

Unbekannt (82, 96, 97)	24.55	1485		x
Unbekannt M: 226 (152, 55, 69)	26.44	1564		x
3-Methylpentadecan	26.52	1567	1571	x
Unbekannt M: 240 (69, 95,83) (37)	26.88	1582		xxx
1-Hexadecanol (39)	33.15	1874	1879	xx
3-Methylnonadecan	34.95	1966	1972	x
1-Octadecanol	37.02	2077	2082	x
1-Eicosanol	40.57	2281	2282	x
1-Docosanol	43.85	2484	2470	x
Cholesterol (112)	52.50	3110	3075	x

[a] Artefakte sind nicht mit aufgeführt, bei unbekannten Verbindungen sind die größten Fragmentationen in Klammern angegeben

[b] Der Retentionsindex / wurde anhand der homologen Reihe der Alkane nach Van den Dool und Kratz bestimmt.

[c] Entnommen aus NIST Chemistry WebBook^[49].

[d] Relative Konzentration: x = 0-2%, xx = 2-5%, xxx = >5%.

[e] In dieser Arbeit synthetisierte Verbindung.

Δ Strukturvorschlag

In der flehmenaktiven Fraktion 1B wurden insgesamt 85 Verbindungen identifiziert. Auch diese bestand hauptsächlich aus gesättigten, unverzweigten Fettsäuremethylestern und methylverzweigten Fettsäuremethylestern. Die Hauptkomponenten dieses Extraktes waren: (*R*)-3,9-Dimethyldecansäuremethylester (**31**), Dodecansäuremethylester (**25**), 3-Methyldodecansäuremethylester (**30**), Hexadecansäuremethylester (**26**) und eine unbekannte Verbindung (**37**).

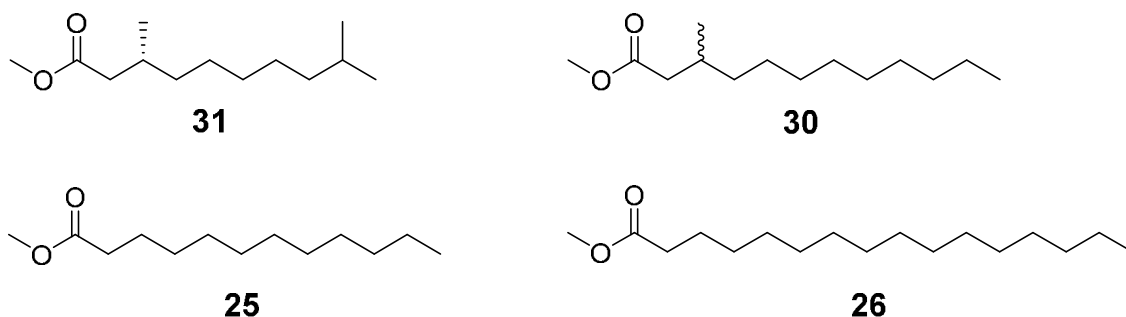


Abb. 17: Hauptkomponenten der flehmenaktiven Fraktion 1B nach Derivatisierung.

Die Hauptkomponenten der Fraktion 1B stimmen mit denen der ersten Fraktion fast überein, mit Ausnahme des 3-Methyldodecansäuremethylesters (**30**). Dieser kommt in der Natur nur sehr selten vor. Der Ester **30** kam zwar in der ersten Fraktion nur in geringer Konzentration vor, doch aufgrund seiner Einzigartigkeit und seiner hohen Konzentration war eine biologische Wirkung wahrscheinlich. Ein weiterer Unterschied bei den Hauptkomponenten bestand darin, dass die erste Fraktion noch Decansäuremethylester (**24**) und Octadecansäuremethylester (**27**) in hoher Konzentration aufwies, wobei letzterer in der Fraktion 1B in mittlerer Konzentration vorkam. Weitere Verbindungen in mittlerer Konzentration in der zweiten Fraktion waren 3,10-Dimethyldodecansäuremethylester (**38**), 1-Hexadecanol (**39**), Octadecansäuremethylester (**27**) und eine unbekannte Verbindung (**33**) (Abb. 18).

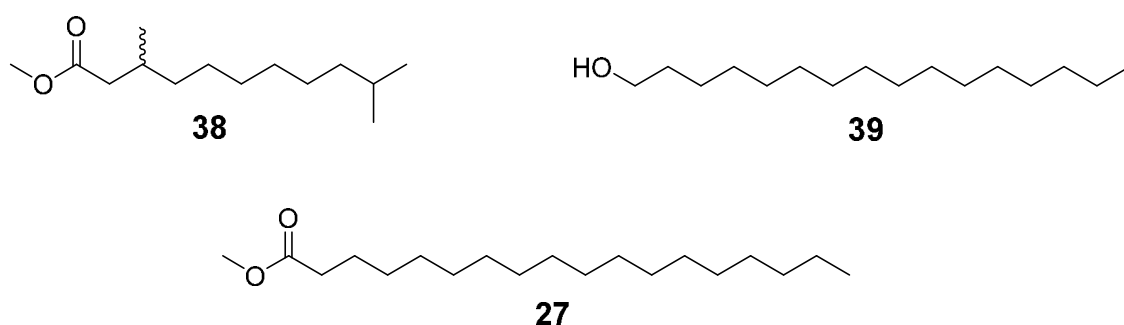


Abb. 18: Verbindungen mit mittlerer Konzentration der flehmenaktiven Fraktion 1B nach Derivatisierung.

Die beiden Fraktionen 1A und B wiesen insgesamt eine hohe Ähnlichkeit zueinander auf. Insgesamt 47 Verbindungen von 64 bzw. 87 Verbindungen waren in diesen Fraktionen identisch. Dies waren in beiden Fällen mehr als die Hälfte der Verbindungen. Die große Ähnlichkeit der beiden Fraktionen ist auch anhand der beiden übereinandergelegten TICs in Abbildung 19 zu erkennen.

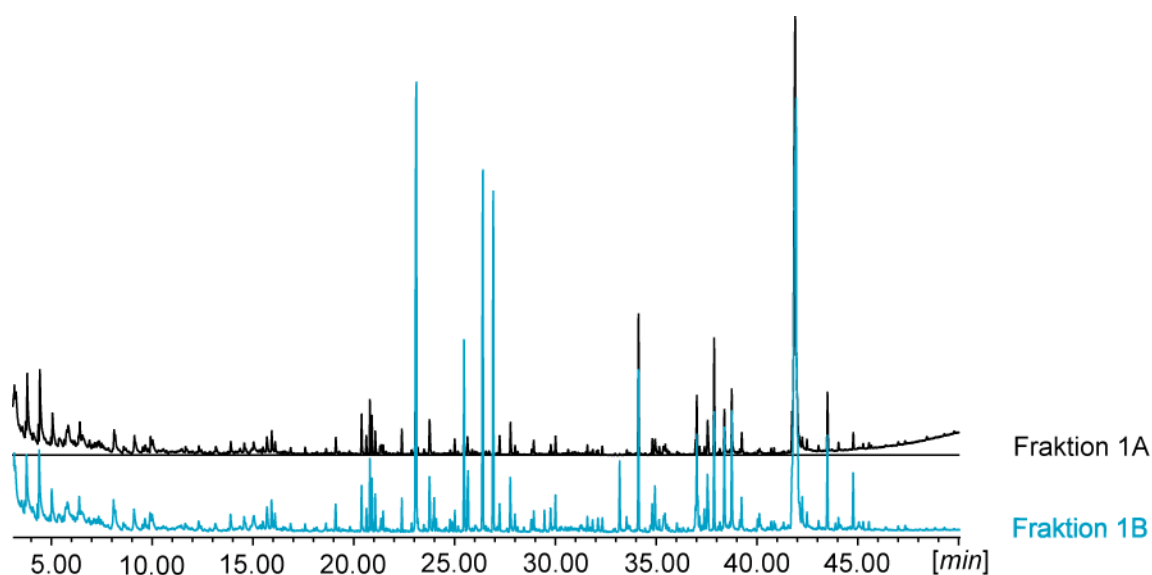


Abb. 19: Vergleich der Totalionenstromchromatogramme der Fraktionen 1A und B.

Neben der Substanzklasse der unverzweigten Fettsäuremethylester waren vor allem auch methylverzweigte Fettsäuremethylester in den beiden Fraktionen zu finden, dabei machten die ω -1 und ω -2 methylverzweigten Ester einen Großteil aus. Im Gegensatz zu den ω -1 methylverzweigten Estern konnten von den Methylestern mit einer ω -2 Methylverzweigung nur Verbindungen mit gerader Kohlenstoffanzahl gefunden werden. Diese Verbindungen wurden in Form von freien Säuren vor allem in Drüsensekreten nachgewiesen. 13-Methyltetradecansäure (**40**), 14-Methylpentadecansäure (**41**) und 14-Methylhexadecansäure (**42**) wurden zum Beispiel in den präorbital Drüsensekreten von weiblichen Sikahirschen (*Cervus nippon*)^[51] und in den ventralen Talgdrüsensekreten von männlichen Dsungarischen Zwerghamstern (*Phodopus sungorus sungorus*)^[52] nachgewiesen. Eine weitere Substanzklasse, die bei den beiden flehmenaktiven Fraktionen auftrat, waren die β -methylverzweigten Fettsäuremethylester. Diese sind in der Natur nur wenig verbreitet. 3-Methyldecansäure (**43**) wurde bisher in Extrakten der Schale von Granatäpfeln (*Punica granatum*)^[53] und im Urin von Karakals (*Caracal caracal*)^[54] gefunden. 3-Methylundecansäure (**44**) konnte bisher im Kot der Schabenart *Blattella germanica* (L.)^[55] und in den Extrakten von Federn des Taubensturmvogels (*Pachyptila desolata*)^[56] nachgewiesen werden. Außerdem wurden 3-Methylundecansäure (**44**) und 3-Methyldodecansäure (**45**) in den Bürzeldrüsensekreten von Schleiereulen (*Tyto alba*) gefunden.^[57]

Der größte Unterschied zwischen den neuen und den in der Masterarbeit untersuchten flehmenaktiven Fraktionen war eine neue HPLC Aufreinigungsmethode, wodurch sich die Anzahl als auch die Intensität der Verbindungen in den neuen Fraktionen deutlich veränderte. Aufgrund dieser Erkenntnisse sollten die beiden alten flehmenaktiven Fraktionen noch einmal im Rahmen dieser Arbeit neu und vertiefter analysiert und mit den neuen Fraktionen verglichen werden, sodass eine Eingrenzung der flehmeninduzierenden Verbindungen möglich sein sollte. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Analyse der beiden alten flehmenaktiven Fraktionen, im weiteren Verlauf Fraktion 2A und B genannt, beschrieben.

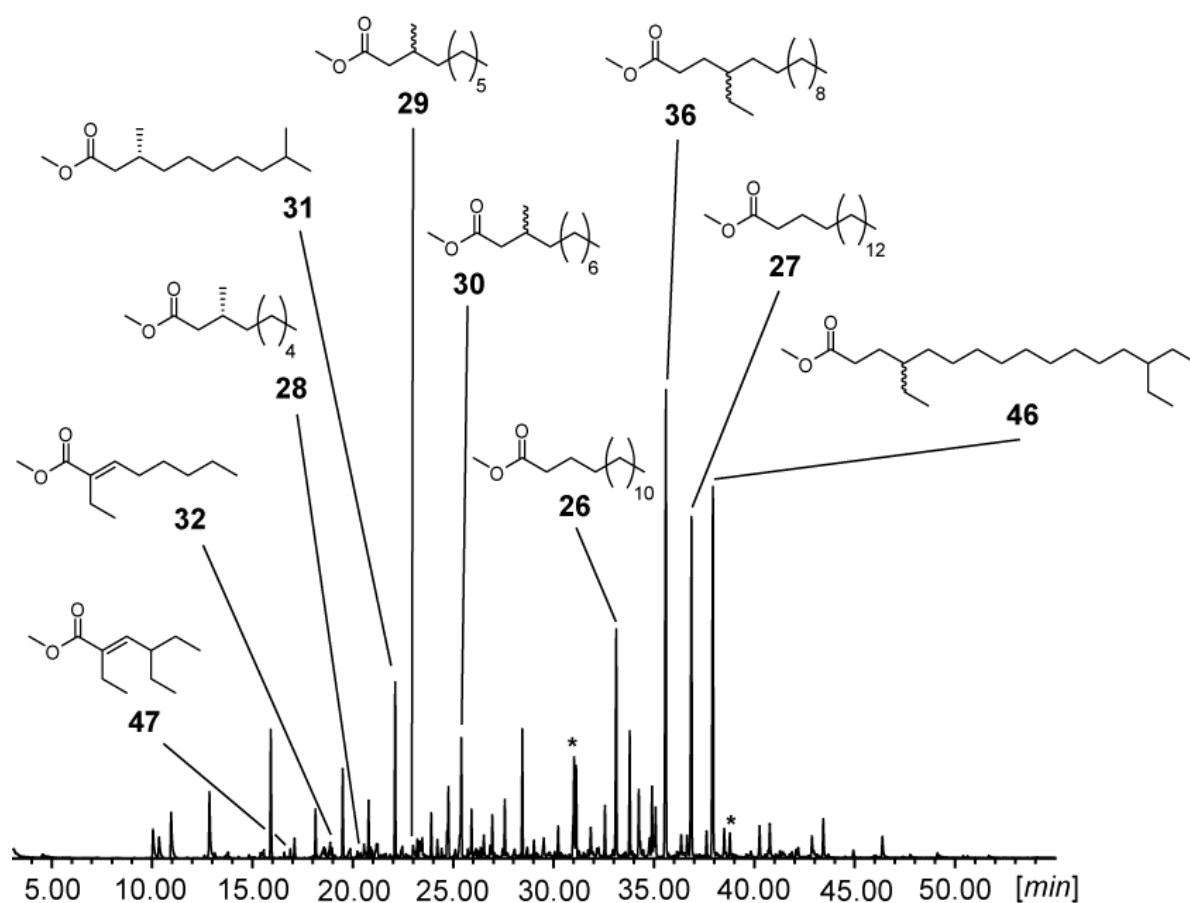


Abb. 20: Totalionenstromchromatogramm der flehmenaktiven Fraktion 2A. Artefakte sind mit * gekennzeichnet. Bei dem Ester **46** handelt es sich um einen Strukturvorschlag.

Tab. 4: Verbindungen der flehmenaktiven Fraktion 2A.

Verbindung ^[a]	RT [min]	RI ^[b]	RI [Lit.] ^[c]	Konzentration ^[d]
Gesättigte unverzweigte Fettsäuremethylester				
Hexadecansäuremethylester (26)	33.12	1922	1926	xxx
Heptadecansäuremethylester (68)	35.01	2021	2021	x
Octadecansäuremethylester (27)	36.87	2123	2128	xxx
Nonadecansäuremethylester (69)	38.58	2222	2221	x
Eicosansäuremethylester (70)	40.26	2322	2332	x
Heneicosanmethylester	41.88	2422	2430	x
Docosansäuremethylester	43.43	2523	2530	x
Tricosansäuremethylester	44.94	2624	2631	x
Tetracosansäuremethylester	46.38	2724	2731	x
Pentacosansäuremethylester	47.77	2824	2823	x
Hexacosansäuremethylester	49.13	2925	2929	x
Heptacosansäuremethylester	50.42	3025	3027	x
Octacosansäuremethylester	51.69	3126	3141	x
α-Methylverzweigte Fettsäuremethylester				
2-Methyl-2-decansäuremethylester (49)	19.50	1324		xx
2-Methyldecansäuremethylester	20.38	1357	1357	x
2-Methylundecansäuremethylester	22.90	1455	1456	x
β-Methylverzweigte Fettsäuremethylester				
(R)-3-Methyldecansäuremethylester (28) ^[e]	20.51	1362	1363	x
3-Methylundecansäuremethylester (29) ^[e]	23.03	1460	1463	x
3-Methyldodecansäuremethylester (30) ^[e]	25.41	1560	1563	xx
3-Methyltridecansäuremethylester (53)	27.70	1661		x
3-Methyltetradecansäuremethylester (54)	29.80	1758		x
ω-1 Methylverzweigte Fettsäuremethylester				
14-Methylpentadecansäuremethylester (71)	32.36	1883	1883	x
16-Methylheptadecansäuremethylester (55)	36.16	2084		x
18-Methylnonadecansäuremethylester (56)	39.62	2283		x
19-Methyleicosansäuremethylester (57)	41.28	2385		x
ω-2 Methylverzweigte Fettsäuremethylester				
16-Methyloctadecansäuremethylester	38.10	2193		x
18-Methyleicosansäuremethylester	41.43	2394		x
20-Methyldocosansäuremethylester	44.53	2596		x
22-Methyltetracosansäuremethylester	47.41	2798		x
α- und ω-1 Dimethylverzweigte Fettsäuremethylester				
2,10-Dimethylundecansäuremethylester	24.42	1517	1517	x
2,16-Dimethylheptadecansäuremethylester	36.68	2113		x

β- und ω-1 Dimethylverzweigte Fettsäuremethylester

(R)-3,9-Dimethyldecansäuremethylester (31) ^[e]	22.11	1424	1426	xx
3,10-Dimethylundecansäuremethylester (38)	24.53	1522		x
3,12-Dimethyltridecansäuremethylester	29.17	1728		x
3,13-Dimethyltetradecansäuremethylester	31.11	1821		x
3,14-Dimethylpentadecansäuremethylester	33.25	1929		x

α-Ethylverzweigte Fettsäuremethylester

2-Ethylhexansäuremethylester	10.95	1044	1043	x
(E)-2-Ethyl-2-octensäuremethylester (32) ^[e]	18.87	1301	1302	x
2-Ethyl-2-undecensäuremethylester ^Δ	23.91	1496		x
2-Ethyl-dodecensäuremethylester ^Δ	26.95	1627		x
2-Ethyl-tetradecensäuremethylester ^Δ	31.13	1822		x

δ-Ethylverzweigte Fettsäuremethylester

4-Ethyltetradecansäuremethylester	31.72	1852		x
4-Ethylhexadecansäuremethylester (36) ^[e]	35.60	2053	2055	xxx

δ- und ω-2 Diethylverzweigte Fettsäuremethylester

4,10-Diethyldodecansäuremethylester ^Δ	30.06	1771		x
4,11-Diethyltridecansäuremethylester ^Δ	32.95	1913		x
4,12-Diethyltetradecansäuremethylester ^Δ	34.24	1980		x
4,12-Diethyltetradecansäuremethylester ^Δ	34.90	2015		x
4,14-Diethylhexadecansäuremethylester ^Δ	37.62	2166		x
4,14-Diethylhexadecansäuremethylester (46) ^Δ	37.94	2184		xxx
4,14-Diethylhexadecansäuremethylester ^Δ	38.50	2217		x

Weitere Fettsäureester und Fettsäuren

2,4-Dimethylhexansäuremethylester ^Δ	10.05	1017		x
2,4-Dimethylhexansäuremethylester ^Δ	10.35	1026		x
2-Ethylheptansäuremethylester + weitere Verzweigung (102, 87, 115) ^Δ	12.61	1091		x
2-Ethyl-5-Methylhexansäuremethylester ^Δ	12.86	1099		x
2-Methylhexansäure ^Δ	13.04	1105		x
2-Ethylhexansäure	13.80	1129	1128	x
2-Ethyl-octansäuremethylester + weitere Verzweigung (102, 87, 55) ^Δ	15.41	1180		x
2-Ethylheptansäure + weitere Verzweigung C ₉ H ₁₈ O ₂ ^Δ	15.57	1186		x
Unbekannter Fettsäureester M: 184 (55, 87, 102) (48)	15.92	1197		xx
(E)-2,4-Diethyl-2-hexensäuremethylester (47) ^[e]	16.88	1231	1234	x
Unbekannter Fettsäureester M: 184 (129, 113, 81)	17.10	1238		x
Unbekannter Fettsäureester M: 184 (141, 81, 109)	18.14	1275		x
Unbekannter Fettsäureester M: 212 (102, 69, 87)	20.56	1364		x
Unbekannter Fettsäureester M: 212 (155, 101, 157)	20.79	1372		x

2-Methylundecensäuremethylester + weitere Verzweigung $C_{13}H_{24}O_2$ Δ	20.89	1376		x
Unbekannter Fettsäureester M: 212 (102, 69, 55)	22.21	1428		x
Unbekannter Fettsäureester M: 198 (141, 56, 43)	22.46	1428		x
Unbekannter Fettsäureester M: 212 (115, 43, 41)	23.00	1459		x
3-Methylundecensäureethylester Δ	23.80	1492		x
2,4,6-Trimethyloctensäuremethylester Δ	25.11	1547		x
2-Ethylundecensäuremethylester + weitere Verzweigung $C_{15}H_{28}O_2$ Δ	27.57	1655		x
2-Ethylundecensäuremethylester + weitere Verzweigung $C_{15}H_{28}O_2$ (50) Δ	28.44	1694		xx
Unbekannter Fettsäureester M: 226 (101, 41, 43)	29.52	1745		x
Unbekannter Fettsäureester M: 268 (95, 69, 83)	30.23	1779		x
2-Ethyltetradecensäuremethylester + weitere Verzweigung $C_{17}H_{32}O_2$ Δ	31.85	1858		x
2-Ethyltetradecensäuremethylester + weitere Verzweigung $C_{17}H_{32}O_2$ Δ	32.56	1893		x
4-Methylhexadecensäuremethylester Δ	34.04	1970		x
2-Ethylhexadecensäuremethylester + weitere Verzweigung (115, 102, 43) Δ	35.73	2060		x
3,7,11,15-Tetramethylhexadecensäuremethylester Δ	36.26	2089		x
9-Octadecensäuremethylester	36.35	2094	2098	x
Eicosensäuremethylester	37.10	2137		x
Octadecensäureethylester	38.02	2189	2193	x
Hexadecensäure-2-hydroxyethylester	38.76	2232		x
11-Eicosensäuremethylester	39.81	2295		x
Octadecensäure-2-hydroxyethylester	42.08	2435		x
Unbekannter Fettsäureester M: 356 (117, 57, 104)	42.87	2486		x
13-Docosensäuremethylester	42.95	2491		x
15-Tetracosensäuremethylester	46.02	2698		x
Weitere Verbindungen				
Unbekannt M: 156 (55, 141, 81)	13.14	1108		x
Unbekannt M: 170 (115, 113, 128)	14.83	1162		x
Unbekannt M: 184 (87, 155, 123)	16.58	1220		x
1-Decanol	18.05	1272	1272	x
Unbekannt M: 170 (55, 83, 41)	18.57	1290		x
Unbekannt M: 198 (155, 123, 95)	18.96	1304		x
Unbekannt M: 170 (127, 81, 109)	19.88	1338		x
Unbekannt M: 212 (155, 123, 95)	20.23	1351		x
Unbekannt M: 196 (45, 163, 55)	20.62	1366		x
Unbekannt M: 174 (70, 132, 71)	20.96	1379		x
Unbekannt M: 212 (113, 83, 55)	21.18	1387		x
Tetradecan (139)	21.41	1396	1400	x

Dodecanal	21.64	1405	1407	x
Unbekannt M: 198 (100, 41, 57)	22.64	1445		x
Unbekannt M: 220 (109, 141, 55)	23.07	1462		x
Unbekannt M: 214 (95, 41, 67)	23.33	1473		x
Unbekannt M: 226 (152, 68, 55)	24.76	1532		x
Unbekannt M: 240 (113, 57, 41)	25.33	1556		x
Unbekannt M: 240 (69, 95, 83) (37)	25.91	1581		x
Hexadecen	26.06	1588	1590	x
Hexadecan	26.23	1595	1600	x
Unbekannt M: 228 (151, 109, 124)	26.37	1601		x
Unbekannt M: 242 (123, 43, 41)	27.47	1650		x
Unbekannt (104, 43, 69)	29.02	1721		x
Unbekannt M: 194 (55, 41, 69)	31.25	1828		x
Unbekannt M: 282 (69, 95, 83)	31.50	1841		x
Unbekannt M: 282 (95, 83, 69)	32.24	1877		x
Unbekannt M: 284 (83, 43, 41)	34.32	1984		x
Schwefel (S ₈)	34.78	2009	2004	x
Unbekannt (45, 57, 43)	40.69	2349		x
Unbekannt M: 328 (117, 104, 55)	40.77	2353		x
Unbekannt (131, 118, 43)	41.07	2372		x
Unbekannt M: 356 (117, 57, 104)	42.87	2486		x

[a] Artefakte sind nicht mit aufgeführt, bei unbekannten Verbindungen sind die größten Fragmentationen in Klammern angegeben

[b] Der Retentionsindex / wurde anhand der homologen Reihe der Alkane nach Van den Dool und Kratz bestimmt.

[c] Entnommen aus NIST Chemistry WebBook^[49].

[d] Relative Konzentration: x = 0-2%, xx = 2-5%, xxx = >5%.

[e] In dieser Arbeit synthetisierte Verbindung.

Δ Strukturvorschlag

In der flehmenaktiven Fraktion 2A des Katzenurins wurden insgesamt 135 verschiedene Verbindungen identifiziert. Generell waren die Extrakte 2A und B konzentrierter, woraus sich die höhere Anzahl an Verbindungen ergab. Dabei handelte es sich zum Großteil um methyl- und ethylverzweigte, gesättigte und ungesättigte Fettsäuremethylester. Viele der Verbindungen waren nicht in der NIST Datenbank registriert. Für diese Verbindungen wurden soweit möglich Strukturvorschläge aus den Massenspektren abgeleitet. Bei den ungesättigten Methylestern ist die Lage der Doppelbindungen zum Teil aufgrund der DMDS-Derivatisierung bekannt, die in der vorangegangenen Mas-

terarbeit durchgeführt wurde. Die vier Hauptkomponenten dieser Fraktion waren Hexadecansäuremethylester (**26**), Octadecansäuremethylester (**27**), 4-Ethylhexadecansäuremethylester (**36**) und 4,14-Diethylhexadecansäuremethylester (**46**) (Abb. 21). Bei Verbindung **46** handelte es sich um einen Strukturvorschlag.

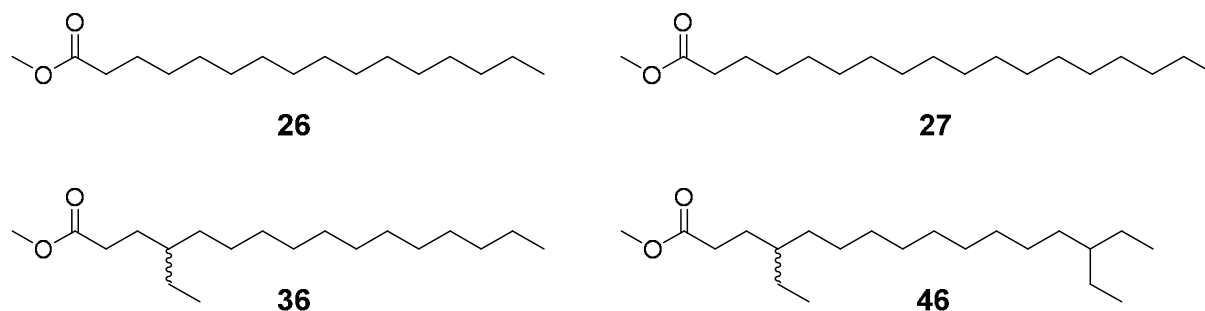


Abb. 21: Hauptkomponenten der flehmenaktiven Fraktion 2A nach Derivatisierung.

Zusätzlich zu den vier Hauptkomponenten gab es noch fünf weitere Verbindungen in mittlerer Konzentration: ein unbekannter Fettsäureester **48**, 2-Methyl-2-decensäuremethylester (**49**), (*R*)-3,9-Dimethyldecansäuremethylester (**31**), 3-Methyldodecansäuremethylester (**30**) und 2-Ethyl-dodecensäuremethylester mit einer weiteren Verzweigung (**47**) (Abb. 22).

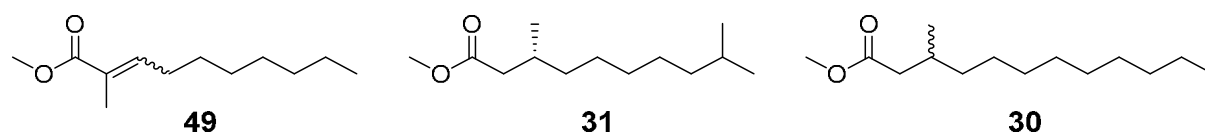


Abb. 22: Verbindungen mit mittlerer Konzentration der flehmenaktiven Fraktion 2A nach Derivatisierung.

Wie oben schon erwähnt, wies die Fraktion 2A aufgrund der unterschiedlichen Aufreinigung eine deutlich höhere Anzahl vor allem auch an unbekannten Verbindungen auf als die beide neuen Fraktionen 1A und B. Bei den Hauptkomponenten gab es bei den gesättigten Fettsäuremethylestern keine Unterschiede, jedoch bei den verzweigten Fettsäuremethylestern. Während in den beiden neuen Fraktionen methylverzweigte

Fettsäuremethylester in hoher Konzentration vorhanden waren, waren es in der Fraktion 2A ethylverzweigte Fettsäuremethylester. Dabei konnten die ethylverzweigten Fettsäuremethylester drei Gruppen eingeteilt werden, die α -ethylverzweigten, die δ -ethylverzweigten und die δ -, ω -2-diethylverzweigten Fettsäuremethylester. Bei den α -ethylverzweigten Fettsäuren wurde bisher nur die 2-Ethylhexansäure (**51**) in der Natur gefunden. Sie wurde zum Beispiel im Urin von männlichen Königstigern (*Panthera tigris*)^[58] und im Urin von afrikanischen Windhunden (*Lycaon pictus*)^[59] nachgewiesen. Bei den δ -ethylverzweigten Fettsäuren wurde bisher nur die 4-Ethyltetradecansäure (**52**) in den Talgdrüsensekreten von männlichen Ziegen identifiziert.^[60] Die δ -, ω -2-diethylverzweigten Fettsäuren sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Bei dieser Gruppe handelt es sich um Strukturvorschläge, die auf Grundlage der Massenspektren abgeleitet wurden. Da sich mehrere Massenspektren sehr ähnlich sahen, wurden die Strukturen mehrfach vorgeschlagen, sodass nicht klar ist, welcher Peak tatsächlich der Struktur entspricht.

Bei den methylverzweigten Fettsäuremethylestern war festzustellen, dass einige dieser Verbindungen schon aus den beiden neuen Fraktionen 1A und B bekannt waren, aber sich die homologe Reihe in der Fraktion 2B weiter fortsetzte. Bei den β -methylverzweigten Fettsäuremethylestern zum Beispiel konnten zu den schon bekannten Estern noch zusätzlich 3-Methyltridecansäuremethylester (**53**) und 3-Methyltetradecansäuremethylester (**54**) identifiziert werden. Bei den ω -1 methylverzweigten Estern fehlten C10-13, dafür konnten 16-Methylheptadecansäuremethylester (**55**), 18-Methylnadecansäuremethylester (**56**) und 19-Methyleicosansäuremethylester (**57**) nachgewiesen werden. Auffällig waren die ω -2 methylverzweigten Ester. Es wurden keine Verbindungen gefunden, die schon in den Fraktionen 1A und B vorkamen, stattdessen traten weitere Ester mit gerader Kohlenstoffanzahl auf. Die freien Säuren dieser Ester, darunter 16-Methyloctadecansäure (**58**), 18-Methyleicosansäure (**59**), 20-Methyldocosansäure (**60**) und 22-Methyltetracosansäure (**61**) kommen in den Phosphorlipidschichten von Schwämmen wie *Calyx podatypa*^[61] und *Pseudospongosorites suberitoides*^[62] vor. Auch bei den β -, ω -1-dimethylverzweigten Estern gab es mit (*R*)-3,9-Dimethyldecansäuremethylester (**31**) nur eine Übereinstimmung, welcher schon in den ersten beiden Fraktionen 1A und B vorkam. Die in Fraktion 2A gefundenen β -, ω -1-dimethylverzweigten Ester bilden eine homologe Reihe und wurden bisher nicht aus der Natur berichtet.

Eicosansäuremethylester (70)	40.26	2322	2332	x
Heneicosansäuremethylester	41.89	2423	2430	x
Docosansäuremethylester	43.44	2523	2530	x
Tricosansäuremethylester	44.93	2623	2631	x
Tetracosansäuremethylester	46.37	2723	2731	x
α-Methylverzweigte Fettsäuremethylester				
2-Methylhexansäuremethylester	8.26	967	969	x
2-Methyl-2-decensäuremethylester (49)	19.49	1324		x
2-Methyldodecansäuremethylester ^Δ	25.00	1542		x
β-Methylverzweigte Fettsäuremethylester				
(R)-3-Methyldecansäuremethylester (28) ^[e]	20.51	1362	1363	x
3-Methylundecansäuremethylester (29) ^[e]	23.02	1460	1463	x
3-Methyldodecansäuremethylester (30) ^[e]	25.40	1559	1563	x
ω-1 Methylverzweigte Fettsäuremethylester				
10-Methylundecansäuremethylester	23.65	1486	1484	x
11-Methyldodecansäuremethylester	25.97	1584	1584	x
12-Methyltridecansäuremethylester	28.21	1684	1683	x
13-Methyltetradecansäuremethylester	30.34	1784	1784	x
14-Methylpentadecansäuremethylester (71)	32.37	1884	1883	x
15-Methylhexadecansäuremethylester (67)	34.31	1984		x
19-Methyleicosansäuremethylester (57)	41.29	2385		x
ω-2 Methylverzweigte Fettsäuremethylester				
11-Methyltridecansäuremethylester (66)	28.40	1692		x
12-Methyltetradecansäuremethylester	30.50	1792	1791	x
14-Methylhexadecansäuremethylester	34.47	1992		x
β- und ω-1 Dimethylverzweigte Fettsäuremethylester				
(R)-3,9-Dimethyldecansäuremethylester (31) ^[e]	22.11	1424	1426	xx
3,10-Dimethylundecansäuremethylester (38) ^Δ	24.69	1529		x
α-Ethylverzweigte Fettsäuremethylester				
2-Ethylhexansäuremethylester	10.96	1044	1043	x
(E)-2-Ethyl-2-octensäuremethylester (32) ^[e]	18.88	1301	1302	x
δ-Ethylverzweigte und δ- und ω-2 Diethylverzweigte Fettsäuremethylester				
4,10-Diethyldodecansäuremethylester ^Δ	30.06	1771		x
4,12-Diethyltetradecansäuremethylester ^Δ	34.90	2015		x
4-Ethylhexadecansäuremethylester (36) ^[e]	35.60	2053	2055	x
4,14-Diethylhexadecansäuremethylester (46) ^Δ	37.90	2182		x
Weitere Fettsäureester und Fettsäuren				
2,4-Dimethylhexansäuremethylester ^Δ	10.05	1017		x
Unbekannter Fettsäureester M: 156 (67, 95, 55)	12.54	1089		x
2,2,5-Trimethyl-4-hexensäuremethylester	12.65	1093		x
Unbekannter Fettsäureester M: 184 (55, 102, 87)	15.92	1197		x

(E)-2,4-Diethyl-2-hexensäuremethylester (47) ^[e]	16.89	1231	1234	x
3,7-Dimethyl-6-octensäuremethylester	17.70	1259	1262	x
4,6-Dimethyloctansäuremethylester	17.94	1268		x
Unbekannter Fettsäureester M: 184 (141, 81, 109)	18.15	1275		x
4,8-Dimethylnonansäuremethylester	19.83	1336	1336	x
Unbekannter Fettsäureester (87, 138, 74)	22.97	1458		x
3-Methylundecansäureethylester ^Δ	23.81	1492		x
Unbekannter Fettsäureester M: 212 (57, 43, 41)	23.90	1496		x
Unbekannter Fettsäureester M: 226 (152, 68, 55)	24.76	1532		x
Unbekannter Fettsäureester (41, 55, 43)	26.52	1608		x
Unbekannter Fettsäureester M: 240 (101, 43, 41)	27.44	1649		x
2-Ethylundecensäuremethylester + weitere Verzweigung C ₁₅ H ₂₈ O ₂ (50) ^Δ	28.44	1694		x
Tetradecensäuremethylester	28.73	1707		x
3,7,11-Trimethyl-6,10-dodecadiensäuremethylester	28.80	1711		x
Unbekannter Fettsäureester M: 268 (82, 81, 95)	30.22	1778		x
Unbekannter Fettsäureester M: 270 (74, 57, 87)	31.81	1856		x
9-Hexadecensäuremethylester	32.59	1895		x
9-Hexadecensäuremethylester (62)	32.71	1901		xxx
11-Hexadecensäuremethylester	32.87	1909		x
Hexadecansäure	33.89	1962	1964	x
9-Hexadecensäureethylester	33.99	1967		x
Hexadecansäureethylester	34.41	1989	1993	x
9-Heptensäuremethylester	34.55	1996		x
11-Heptensäuremethylester	34.72	2006		x
Tetradecansäure-2-hydroxyethylester	35.18	2030		x
9,12-Octadecadiensäuremethylester (63)	36.28	2090	2093	xxx
9-Octadecensäuremethylester (64)	36.49	2102		xxx
11-Octadecensäuremethylester (65)	36.56	2106		xxx
13-Octadecensäuremethylester	36.68	2113		x
Unbekannter Fettsäureester (55, 69, 265)	37.05	2133		x
Unbekannter Fettsäureester M: 294 (67, 95, 81)	37.15	2140		x
9,12-Octadecadiensäureethylester	37.44	2156	2159	x
9-Octadecensäureethylester	37.55	2162	2169	x
3,7,11,15-Tetramethyl-6,10,14-hexadecatriensäuremethylester	37.65	2168		x
9-Nonadecensäuremethylester	38.09	2193		x
11-Nonadecensäuremethylester	38.29	2205		x
Hexadecansäure-2-hydroxyethylester	38.76	2232		x
Eicosatetraensäuremethylester	39.09	2252		x
Hexadecansäure-2,3-dihydroxypropylester	39.14	2255		x
9,12-Octadecadiensäure-1-methylethylester	39.30	2265		x

Eicosadiensäuremethylester	39.73	2290		x
11-Eicosensäuremethylester	39.82	2295		x
13-Eicosensäuremethylester	39.93	2302		x
Unbekannter Fettsäureester M: 324 (67, 81, 95)	41.60	2404		x
Octadecensäure-2-hydroxyethylester	41.67	2409		x
Octadecensäure-2-hydroxyethylester	42.00	2430		x
Octadecensäure-2-hydroxyethylester	42.10	2437		x
13-Docosensäuremethylester	42.96	2492		x
15-Tetracosensäuremethylester	46.02	2698		x

Weitere Verbindungen

Limonen (127)	10.34	1026	1028	x
Undecan	12.84	1098	1100	x
Unbekannt M: 156 (55, 141, 81)	13.13	1107		x
Decanal (76)	16.10	1203	1206	x
Unbekannt M: 152 (69, 102, 55)	17.04	1236		x
1-Decanol	18.02	1271	1272	x
Unbekannt M: 182 (93, 125, 79)	19.41	1320		x
1-Undecanol	20.75	1371	1370	x
Unbekannt (113, 83, 43)	21.17	1387		x
Tetradecan (139)	21.41	1396	1400	x
Dodecanal	21.64	1405	1407	x
Unbekannt M: 180 (55, 41, 69)	22.66	1446		x
1-Dodecanol	23.28	1471	1473	x
Unbekannt M: 182 (57, 43, 71)	23.99	1499		x
Unbekannt M: 182 (57, 71, 41)	24.06	1502		x
Unbekannt (81, 67, 68)	24.87	1537		x
1-Tridecanol	25.68	1571	1575	x
Unbekannt M: 240 (69, 95, 83) (37)	25.91	1581		x
Hexadecen	26.06	1588	1590	x
Hexadecan	26.23	1595	1600	x
Unbekannt M: 282 (57, 43, 239)	33.84	1960		x
Juvabion	34.84	2012	2017	x
Unbekannt M: 296 (110, 82, 142)	35.86	2068		x
Unbekannt M: 324 (110, 82, 142)	38.19	2199		x
Unbekannt M: 294 (45, 55, 69)	39.40	2270		x
Unbekannt M: 294 (45, 55, 69)	39.51	2277		x

[a] Artefakte sind nicht mit aufgeführt, bei unbekannten Verbindungen sind die größten Fragmentationen in Klammern angegeben

[b] Der Retentionsindex / wurde anhand der homologen Reihe der Alkane nach Van den Dool und Kratz bestimmt.

[c] Entnommen aus NIST Chemistry WebBook^[49].

[d] Relative Konzentration: x = 0-2%, xx = 2-5%, xxx = >5%.

[e] In dieser Arbeit synthetisierte Verbindung.

Δ Strukturvorschlag

In der flehmenaktiven Fraktion 2B des Katzenurins wurden 123 verschiedene Substanzen identifiziert. Wie schon in der Fraktion 2A bildeten die methyl- und ethylverzweigten, gesättigten und ungesättigten Fettsäuremethylester die am häufigsten auftretenden Substanzklassen. Die sechs Hauptkomponenten der Fraktion 2B waren 9-Hexadecensäuremethylester (**62**), Hexadecansäuremethylester (**26**), 9,12-Octadecadiensäuremethylester (**63**), 9-Octadecensäuremethylester (**64**), 11-Octadecensäuremethylester (**65**) und Octadecansäuremethylester (**27**) (Abb. 24). Wie schon in der Fraktion 2A sind Hexadecansäuremethylester (**26**) und Octadecansäuremethylester (**27**) in hoher Konzentration enthalten, ansonsten unterschieden sich die Hauptkomponenten der beiden Fraktionen aber eindeutig voneinander. Während in der Fraktion 2A noch zwei ethylverzweigte Fettsäuremethylester **36** und **46** die Hauptkomponenten bildeten, waren es in der Fraktion 2B ausschließlich gesättigte und ungesättigte, unverzweigte Fettsäuremethylester.

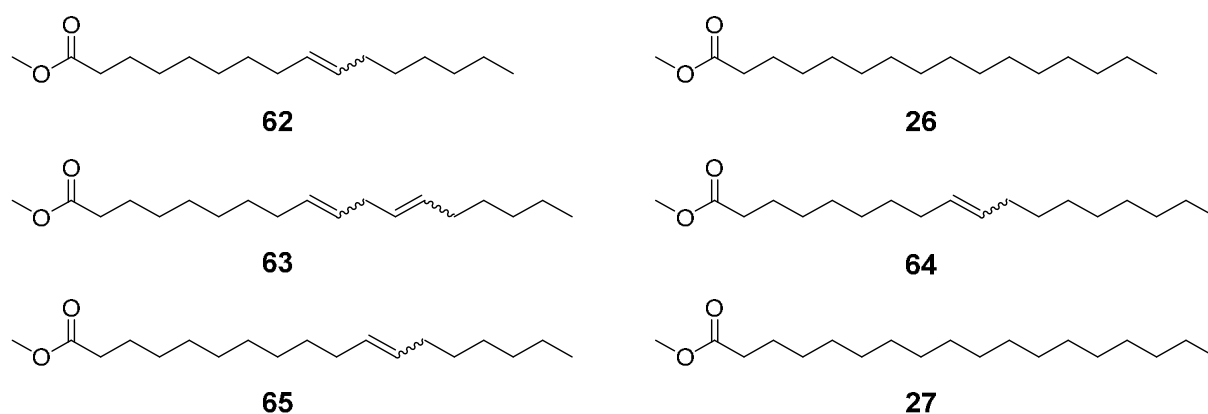


Abb. 24: Hauptkomponenten der flehmenaktiven Fraktion 2B nach Derivatisierung.

Zusätzlich zu den sechs Hauptkomponenten gab es noch zwei weitere Verbindungen in mittlerer Konzentration: (*R*)-3,9-Dimethyldekansäuremethylester (**31**) und Tetradekansäuremethylester (**35**) (Abb. 25).

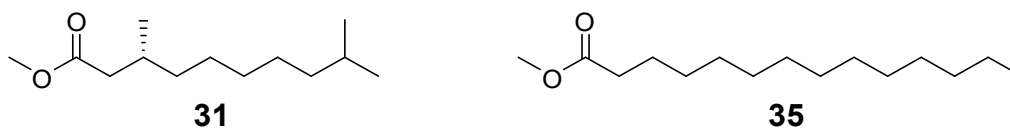


Abb. 25: Verbindungen mit mittlerer Konzentration der flehmenaktiven Fraktion 2B nach Derivatisierung.

Insgesamt waren in der Fraktion 2B deutlich mehr ungesättigte Fettsäuremethylester vorhanden als in allen anderen Fraktionen. Bei den β -methylverzweigten und β -, ω -1-dimethylverzweigten Fettsäuremethylestern wies die Fraktion 2B eine hohe Ähnlichkeit zu der Fraktion 1B auf. Insgesamt 41 von 119 (2B) bzw. 85 (1B) Verbindungen waren identisch (Abb. 26). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei beiden Fraktionen um die jeweils zweite Fraktion handelt, die auf der HPLC abgetrennt wurde. Zwei Verbindungen traten allerdings in diesen Substanzklassen das erste Mal auf: 11-Methyltridecansäuremethylester (**66**) und 15-Methylhexadecansäuremethylester (**67**). Beide wurden als freie Säuren schon in Talgdrüsensekreten von männlichen Dsungarischen Zwerghamstern (*Phodopus sungorus sungorus*)^[63] und letztere auch in den präorbital Drüsensekreten von weiblichen Sikahirschen (*Cervus nippon*)^[51] nachgewiesen.

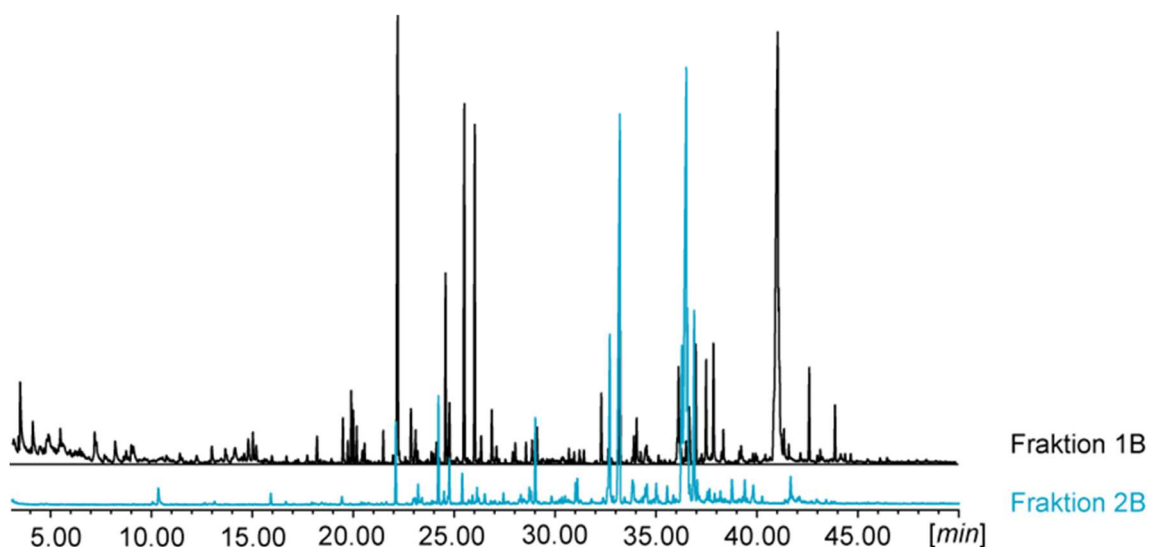


Abb. 26: Vergleich der Totalionenstromchromatogramme der Fraktionen 1B und 2B.

Werden die Fraktionen 1A und 2A miteinander verglichen war eine geringe Übereinstimmung zu beobachten. Bei diesen beiden Fraktionen handelte es sich um die jeweils ersten Fraktionen aus der HPLC Auftrennung des Urins. Nur 15 Verbindungen von 64 im Falle der Fraktion 1A bzw. 122 im Fall von Fraktion 2A sind identisch. Diese geringe Ähnlichkeit der beiden Fraktionen ist auch anhand der beiden übereinandergelegten TICs in Abbildung 27 zu erkennen.

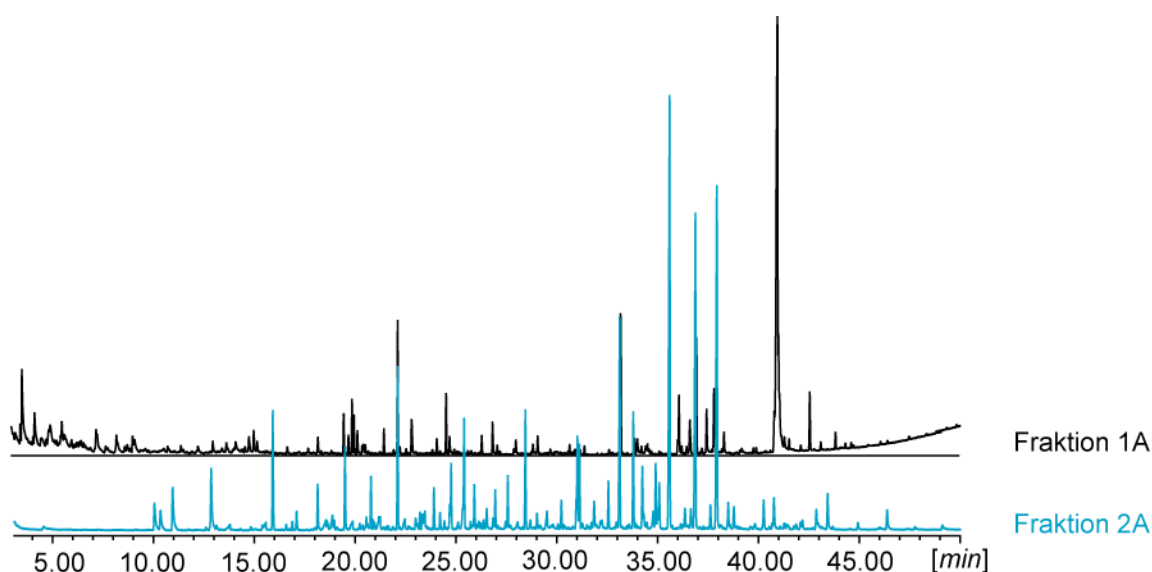


Abb. 27: Vergleich der Totalionenstromchromatogramme der Fraktionen 1A und 2A.

Ähnlich sieht es aus, wenn die Fraktionen 2A und B miteinander verglichen werden. Nur 43 von 122 (2A) bzw. 119 (2B) Verbindungen waren identisch. Damit stimmen nur ungefähr ein Drittel der Verbindungen überein (Abb. 28). Das ist zwar fast die gleiche Verbindungsanzahl wie bei dem Vergleich der Fraktionen 1A und B, jedoch haben Fraktionen 2A und B eine wesentlich höhere Gesamtzahl an Verbindungen.

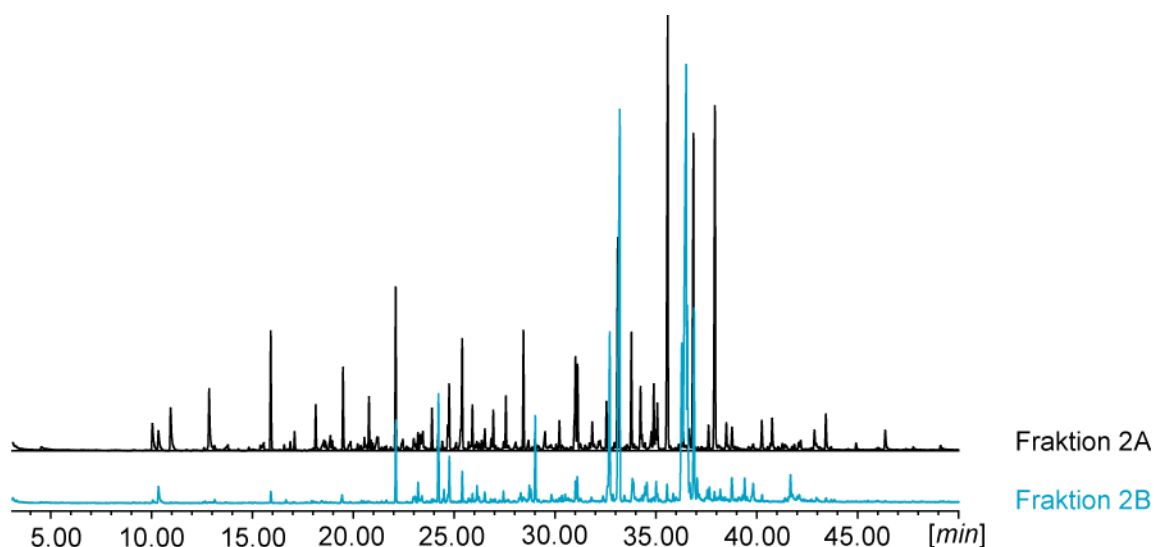


Abb. 28: Vergleich der Totalionenstromchromatogramme der Fraktionen 2A und B.

Unter der Annahme, dass das Flehmenverhalten immer von denselben Verbindungen ausgelöst wird, müssten die Verbindungen, die in allen vier Fraktionen gefunden wurden, potentiell flehmenaktiv sein. Dies schränkte die Anzahl der möglichen Verbindungen deutlich ein. Insgesamt gab es nur 12 Verbindungen die in allen vier Fraktionen zu finden sind. Dies sind (*E*)-2-Ethyl-2-octensäuremethylester (**32**), (*R*)-3-Methyldecansäuremethylester (**28**), 3-Methylundecansäuremethylester (**29**), (*R*)-3,9-Dimethyldecansäuremethylester (**31**), 3-Methyldodecansäuremethylester (**30**), Hexadecansäuremethylester (**26**), Heptadecansäuremethylester (**68**), Octadecansäuremethylester (**27**), Nonadecansäuremethylester (**69**), Eicosansäuremethylester (**70**), 14-Methylpentadecansäuremethylester (**71**) und eine unbekannte Verbindung (**37**) (Abb. 29). Außerdem gab es noch 31 weitere Verbindungen, die aber nur jeweils in drei von den vier Fraktionen vorhanden waren. Dabei war zu beobachten, dass die meisten Verbindungen entweder in der Fraktion 1A oder 2A fehlten. Wenn die Verbindungen in nur einer Fraktion nicht nachgewiesen werden konnten, könnten die Verbindungen trotzdem potentiell flehmenaktiv sein. Denn die Konzentration der Verbindungen könnte zum Beispiel unter dem Detektionsniveau gelegen haben oder sie wurden von anderen Verbindungen überlagert und wurden deswegen nicht nachgewiesen.

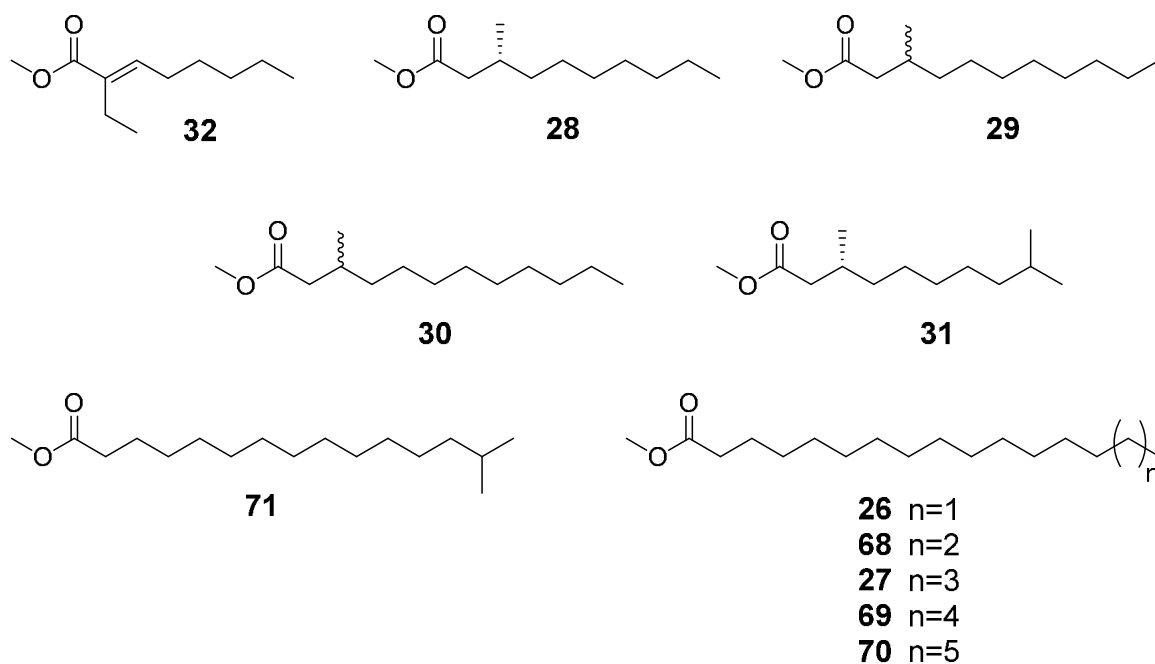


Abb. 29: Verbindungen, die in allen vier flehmenaktiven Fraktionen nachgewiesen wurden.

Bei den oben gezeigten Verbindungen (*E*)-2-Ethyl-2-octensäuremethylester (**32**), (*R*)-3-Methyldecansäuremethylester (**28**), 3-Methylundecansäuremethylester (**29**), 3-Methyldodecansäuremethylester (**30**) und (*R*)-3,9-Dimethyldecansäuremethylester (**31**) handelte es sich um Strukturvorschläge, die mittels Synthese im Rahmen dieser Arbeit bestätigt und bei anschließenden Biotests mit den Katzen auf ihre Flehmenaktivität hin getestet werden sollten. Zusätzlich gab es einige weitere interessante Strukturen wie (*E*)-2,4-Diethyl-2-hexensäure (**72**) und 4-Ethylhexadecansäure (**73**), die wenig bis gar nicht literaturbekannt waren und deren Struktur auch mittels Synthese verifiziert werden sollte. Auf die Strukturaufklärung, Synthese und die Biotests dieser Verbindungen wird in dem folgenden Kapitel eingegangen.

3.3 Strukturaufklärung, Synthese und Biotests

Im folgenden Kapitel werden alle synthetisierten Verbindungen vorgestellt. Die Identifizierung der Fettsäuremethylester erfolgte anhand der charakteristischen Fragmentierungen in den EI-Massenspektren. RYHAGEN und STENHAGEN untersuchten bereits

1960 ausführlich die charakteristischen Fragmentierungsmuster von verzweigten Fettsäuremethylestern.^{[64],[65],[66]} Je nach Art der Verzweigung und Position in der Kohlenstoffkette, bilden sich typische Fragmentierungsmuster anhand deren sie charakterisiert werden können. Im folgenden Kapitel wurde für jede Verbindung zunächst der Strukturvorschlag diskutiert, anschließend die Synthese beschrieben und zum Schluss das Ergebnis des Biotests auf Flehmenaktivität vorgestellt.

3.3.1 3-Methyldodecansäure (45)

Befindet sich bei einem Methylester eine Methylverzweigung in β -Position werden die typischen Fragmentationen $m/z = 74$ als Basepeak durch die McLafferty Umlagerung und $m/z = 101$ durch eine β -Spaltung gebildet. Weitere typische Ionen sind $M^+ - 15$ für die Abspaltung der Methylgruppe, $M^+ - 31$ für die Abspaltung der Methoxygruppe, $M^+ - 43$ für Verlust von $C_2 - C_3$ inklusive der Methylgruppe und anschließender Rekombination der Reste, sowie $M^+ - 57$ für Verlust von $C_2 - C_4$ inklusive der Methylgruppe und anschließender Rekombination der Reste.^[65]

Die erste der drei Verbindungen die synthetisiert wurde, war 3-Methyldodecansäure (45). Diese fiel in den flehmenaktiven Fraktionen 1B und 2A durch ihre hohe Konzentration auf. Das Massenspektrum zeigte die typischen Ionen für β -methylverzweigte Methylester, $m/z = 213$ ($M^+ - CH_3$), $m/z = 197$ ($M^+ - OCH_3$), $m/z = 185$ ($M^+ - CH_2CH(CH_3)$), $m/z = 171$ ($M^+ - CH_2CH(CH_3)CH_2$), $m/z = 101$ und $m/z = 74$ als Basepeak (Abb. 30).

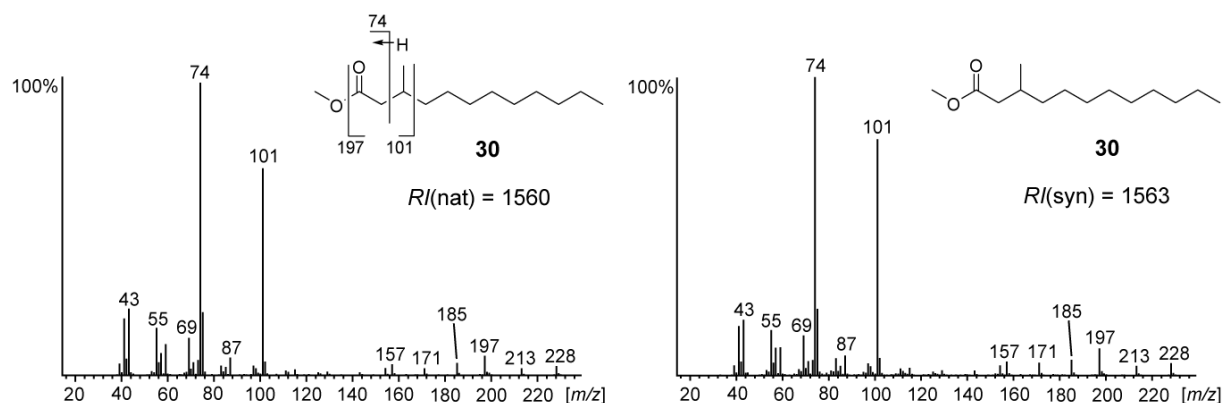


Abb. 30: Massenspektren des Naturstoffs (links) und des synthetisierten 3-Methyldodecansäuremethylesters (30) (rechts).

Die Synthese erfolgte für alle drei Verbindungen 3-Methyldecansäure (**43**), 3-Methylundecansäure (**44**) und 3-Methyldodecansäure (**45**) nach demselben Schema (Abb. 31). Zur Darstellung wurden Octanal (**74**), Nonanal (**75**) und Decanal (**76**) jeweils in einer WITTIG-Reaktion mit (Methoxycarbonylmethylen)-triphenylphosphoran zu den entsprechenden ungesättigten Estern **77**, **78** und **79** umgesetzt.^[67] Die Einführung der Methylgruppe in β -Position erfolgte in einer kupferkatalysierten MICHAEL-Addition und lieferte die gewünschten Ester **80**, **29** und **30**. NAKAMURA und KUWAJIMA *et al.* fanden bei diesem Reaktionstyp heraus, dass der Einsatz von Chlortrimethylsilan und HMPA nicht nur das Enolat-Ion stabilisieren, sondern die Additions-Reaktion beschleunigen kann, was im Gegensatz zu herkömmlichen kupferorganischen Verbindungen zu viel höheren Ausbeuten führt.^[68] Im letzten Schritt erfolgte die Verseifung zu den entsprechenden Säuren **43**, **44** und **45** (Abb. 31).^[69]

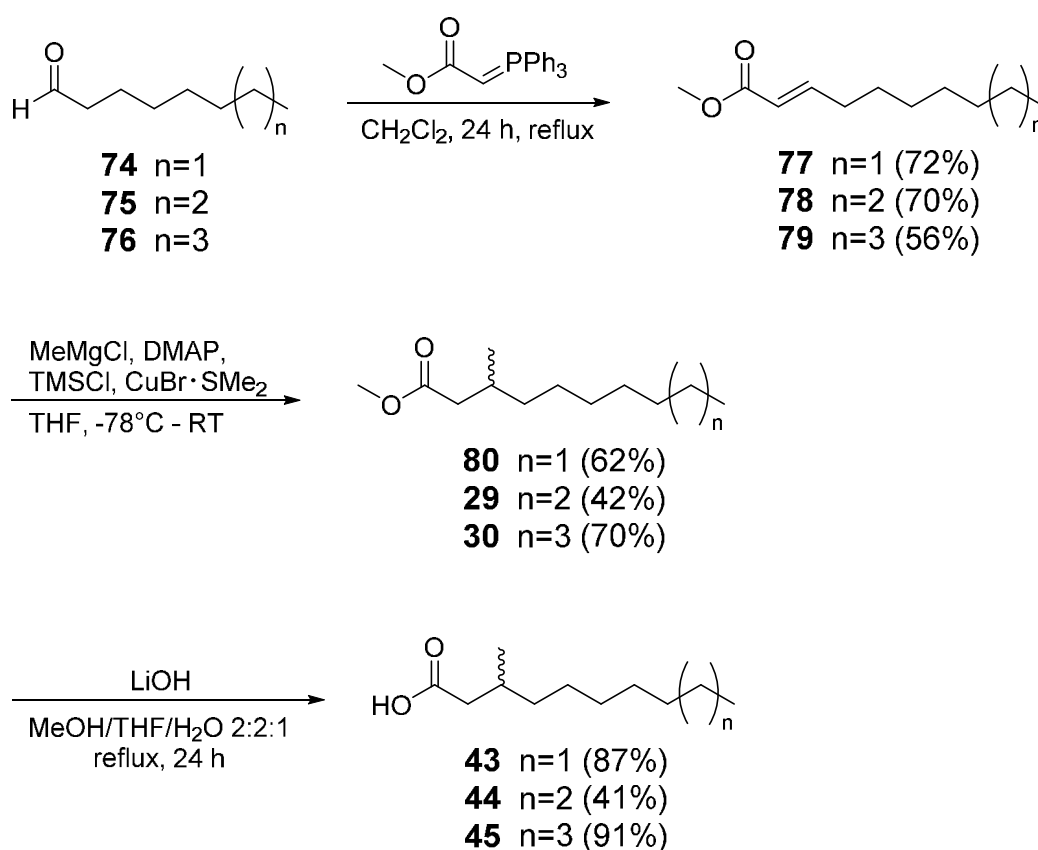


Abb. 31: Synthese von 3-Methyldecansäure (**43**), 3-Methylundecansäure (**44**) und 3-Methyldodecansäure (**45**).

Der Vergleich der Massenspektren des Naturstoffs mit dem der synthetisierten Verbindung zeigte eine sehr gute Übereinstimmung (Abb. 30). Auch die Retentionsindices mit $RI_{\text{nat}} = 1560$ und $RI_{\text{syn}} = 1562$ sind nahezu identisch. In Biotests mit Katzen, die von der Arbeitsgruppe MIYAZAKI durchgeführt wurden, wies 3-Methyldodecansäure (**45**) keine Flehmenaktivität auf.

3.3.2 3-Methylundecansäure (**44**)

3-Methylundecansäure (**44**) wurde ursprünglich synthetisiert, um die Struktur eines unbekannten Methylesters mit einer Methylverzweigung in β -Position aufzuklären. Dieser unbekannte Methylester war in allen flehmenaktiven Fraktionen in mittlerer oder hoher Konzentration vorhanden. In der zweiten neuen flehmenaktiven Fraktion war dieser Peak sogar der mit der höchsten Konzentration und stand somit im Verdacht eine der flehmeninduzierenden Verbindungen zu sein. Der synthetisierte 3-Methylundecansäuremethylester (**29**) zeigte jedoch einige kleinere Abweichungen im Massenspektrum zu dem unbekannten 3-Methylester (Abb. 32). Die Ionen für die Methylverzweigung in β -Position waren alle in ähnlicher Intensität vorhanden wie bei 3-Methylundecansäuremethylester (**29**), mit der Ausnahme von den Ionen $m/z = 83$, $m/z = 101$ und $m/z = 157$, die bei dem unbekannten Methylester eine etwas höhere Intensität aufwiesen. Zudem stimmten die Retentionsindices der beiden Verbindungen nicht überein. Der unbekannte Methylester stellte sich am Ende als 3,9-Dimethyldecansäuremethylester (**81**) heraus auf den in Kapitel 3.3.4 genauer eingegangen wird. Besitzen methylverzweigte Fettsäuremethylester wie 3,9-Dimethyldecansäuremethylester (**81**) eine weitere Verzweigung in ω -1-Position ist diese im Massenspektrum kaum zu erkennen, weswegen Synthesen dieser Verbindungen zwingend notwendig waren. Die Synthese des 3-Methylundecansäuremethylesters (**29**) war jedoch trotzdem ein Erfolg, denn es konnte damit die Struktur einer Verbindung aufgeklärt werden, die in allen Fraktionen vorkam, aber mit Ausnahme der Fraktion 1B, von einer anderen Verbindung überlagert wurde, sodass kein eindeutiges Massenspektrum zu erkennen war (Abb. 32). Im Biotest zeigte 3-Methylundecansäure (**44**) keine Flehmenaktivität.

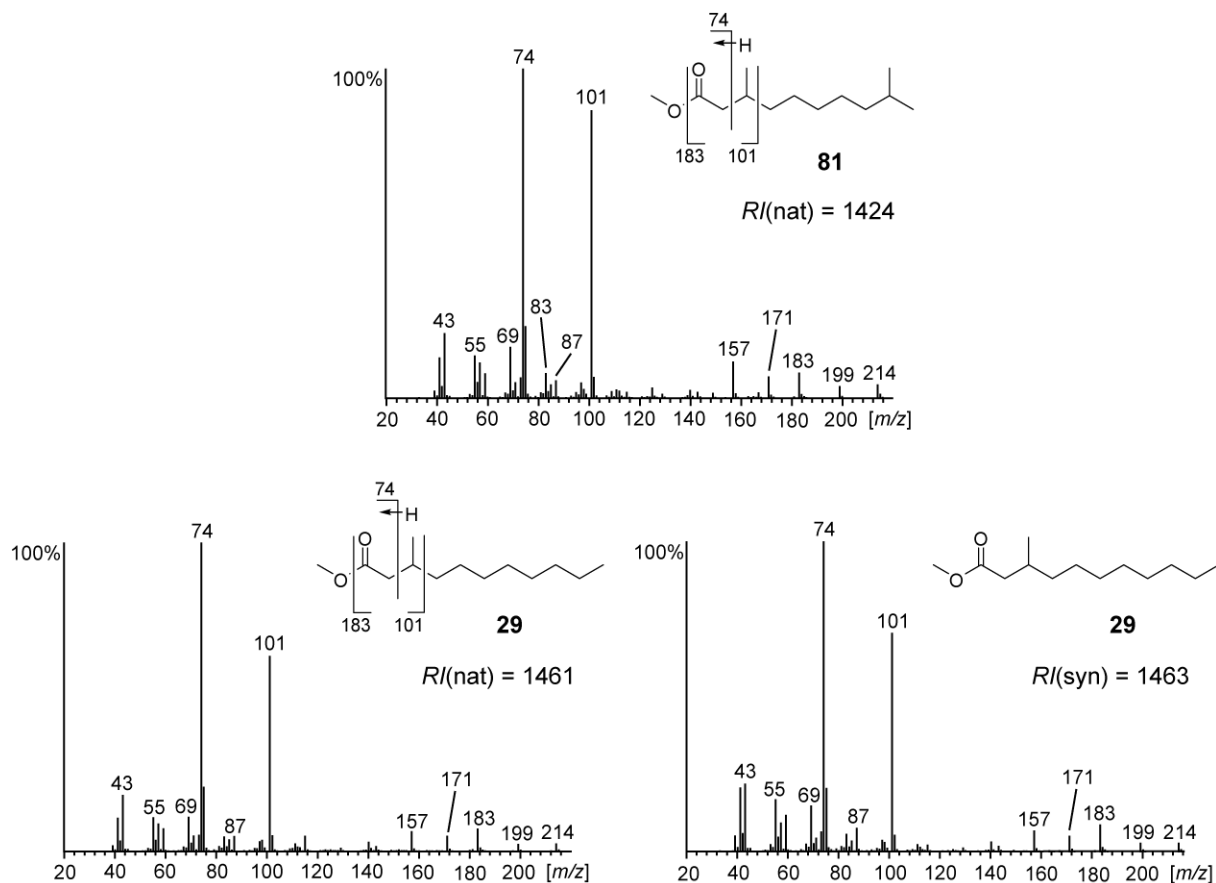


Abb. 32: Massenspektren des zunächst unbekannten Naturstoffs (**81**), 3,9-Dimethyldecansäuremethylester (**81**) (oben), des identifizierten Naturstoffs (unten links) und des synthetisierten 3-Methylundecansäuremethylesters (**29**) (unten rechts).

3.3.3 3-Methyldecansäure (43)

Die dritte Verbindung, die in alle vier flehmenaktiven Fraktionen gefunden wurde, war 3-Methyldecansäuremethylester (**80**). Diese zeigte im Massenspektrum, genauso wie die vorherigen Verbindungen, die typischen Ionen für β -methylverzweigte Methylester: $m/z = 185$ ($M^+ - CH_3$), $m/z = 169$ ($M^+ - OCH_3$), $m/z = 157$ ($M^+ - CH_2CH(CH_3)$), $m/z = 143$ ($M^+ - CH_2CH(CH_3)CH_2$), $m/z = 101$ und $m/z = 74$ als Basepeak (Abb. 33).

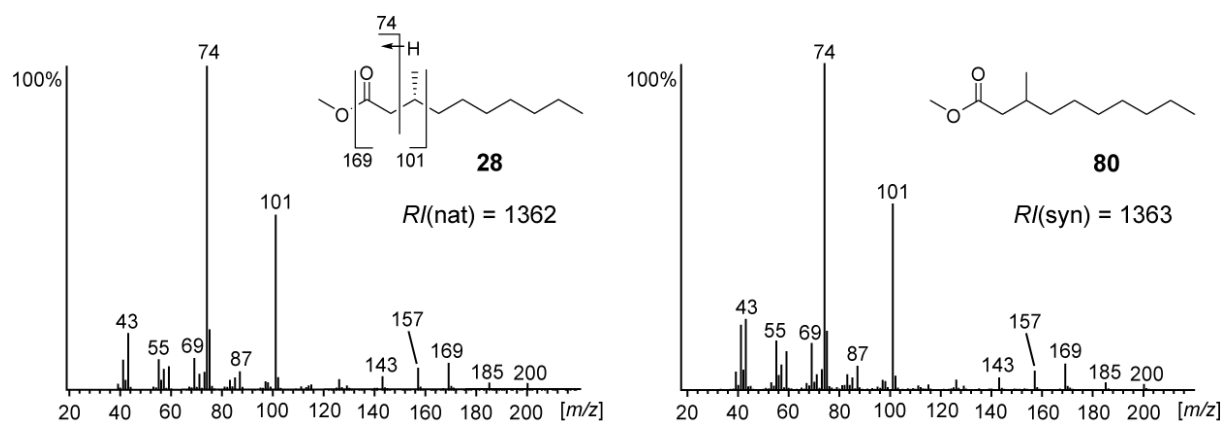


Abb. 33: Massenspektren des Naturstoffs (links) und des synthetisierten 3-Methyldecansäuremethylesters (**80**) (rechts).

Die Synthese von 3-Methyldecansäure (**43**) erfolgte analog zu den Synthesen von den anderen β -methylverzweigten Fettsäuren **44** und **45** und ist in Kapitel 3.3.1 beschrieben.

Der Vergleich der Massenspektren und des Retentionsindex des Naturstoffs und des synthetisierten 3-Methyldecansäuremethylesters (**80**) zeigte, dass diese sehr gut übereinstimmen (Abb. 33).

Der Biotest von *rac*-3-Methyldecansäure (**43**) fiel positiv aus. Die getesteten Katzen zeigten deutlich das Flehmenverhalten, wenn ihnen eine Probe der Substanz zum Schnuppern unter die Nase gehalten wurde. Der Blindtest wurde mit Hexan durchgeführt, was bei den Katzen keine Reaktion hervorrief. Es ist aber davon auszugehen, dass diese Substanz nicht allein als Auslöser für das Flehmenverhalten bei Katzen verantwortlich ist. Einerseits weil dafür die Reaktion der Katzen noch nicht so stark ausgeprägt war wie bei den original Fraktionen, andererseits weil auch andere synthetisierte Verbindungen später das Verhalten auslösten.

Da es sich bei dem Kohlenstoffatom in β -Position um ein stereogenes Zentrum handelte, sollte die genaue Konfiguration des Naturstoffs durch enantioselektive Synthese der 3-Methyldecansäure (**43**) herausgefunden werden. Die Synthese erfolgte analog zu der der racemischen 3-Methyldecansäure (**43**) mit Ausnahme dass bei der 1,4-Addition ein chiraler Katalysator verwendet wurde (Abb. 34).^[70] LOH *et al.*^[71] erforschte im letzten Jahrzehnt die Verwendung von Kupfer-katalysierten chiralen Liganden (CuI-(*R*)- oder (*S*)-Tol-BINAP (**82,83**)) in Gegenwart einer Grignard-Verbindung zur Addition

an α , β -ungesättigte Ester. Dies ermöglichte letztlich eine stereoselektive Kontrolle der konjugierten Addition.^[72] Die Ausbeuten des (*R*)- bzw. (*S*)-3-Methyldecansäureesters (**28**, **84**) bei dieser Reaktion waren zwar nicht sehr hoch, dafür war die Enantiomerenreinheit mit 97% sehr gut. Anschließend wurden die Ester mit sehr guten Ausbeuten zu den korrespondierenden Säuren ((*R*)-**85**, (*S*)-**86**) verseift.^[69]

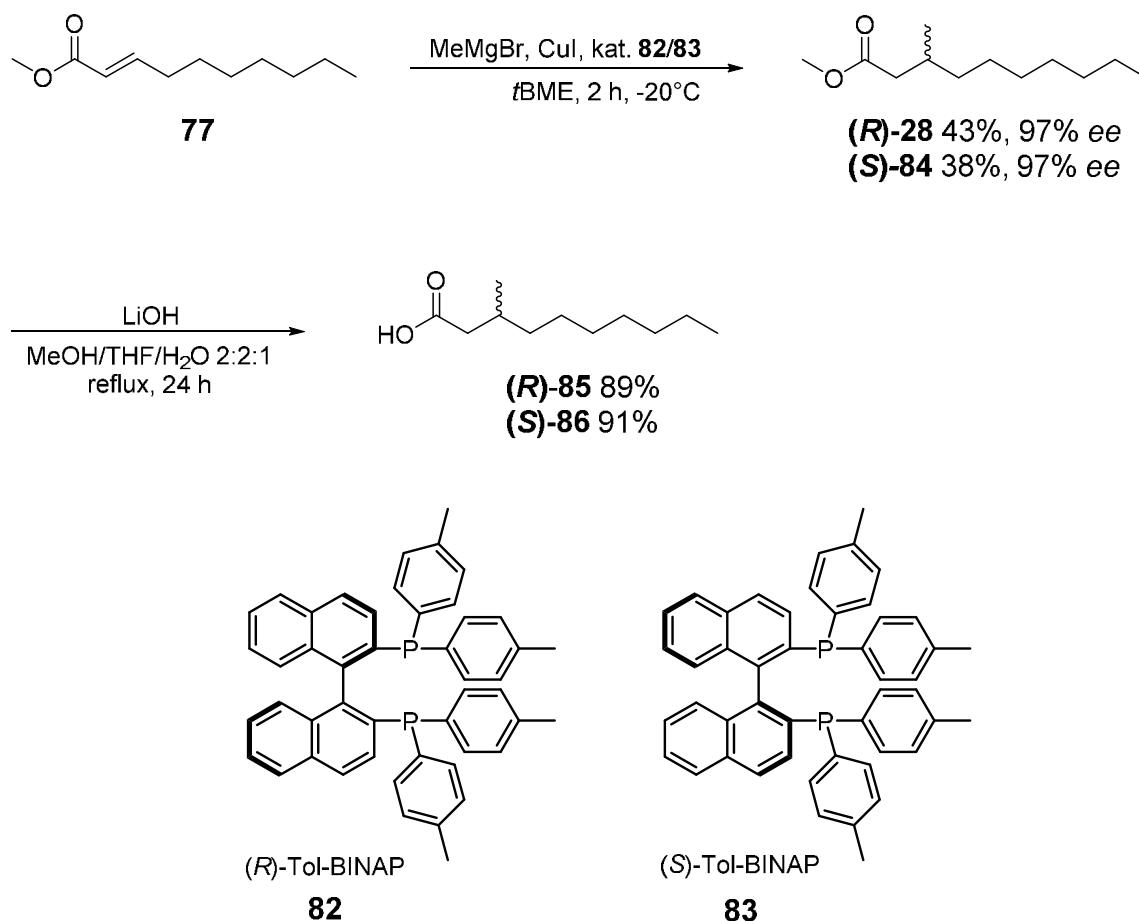


Abb. 34: Synthese von (*R*)-3-Methyldecansäure (**85**) und (*S*)-3-Methyldecansäure (**86**).

Um die absolute Konfiguration des Naturstoffs zu bestimmen, wurden gaschromatographische Untersuchungen an chiraler Phase durchgeführt. Für das synthetisierte Racemat des 3-Methyldecansäuremethylesters (**80**) wurde zunächst eine Methode für die Trennung auf einer chiralen Hydrodex-6-TBDMS-Phase (25 m) entwickelt. Eine akzeptable Grundlinien-Trennung konnte durch die Verwendung eines Temperaturprogramms mit einer flachen Rampe nach 240 min ermöglicht werden (240 min bei 55°C, dann 2°C/min auf 100°C, dann 25°C/min auf 220°C). Anschließend wurden die

synthetisierten Enantiomere einzeln mit demselben Temperaturprogramm vermessen und zum Schluss der Naturstoff. Der Vergleich der Enantiomere des 3-Methyldecansäuremethylesters (**28**, **84**) mit dem Urinextrakt der Katzen ergab, dass es sich bei der natürlich vorkommenden Säure um die (*R*)-3-Methyldecansäure (**28**) handelt (Abb. 35).

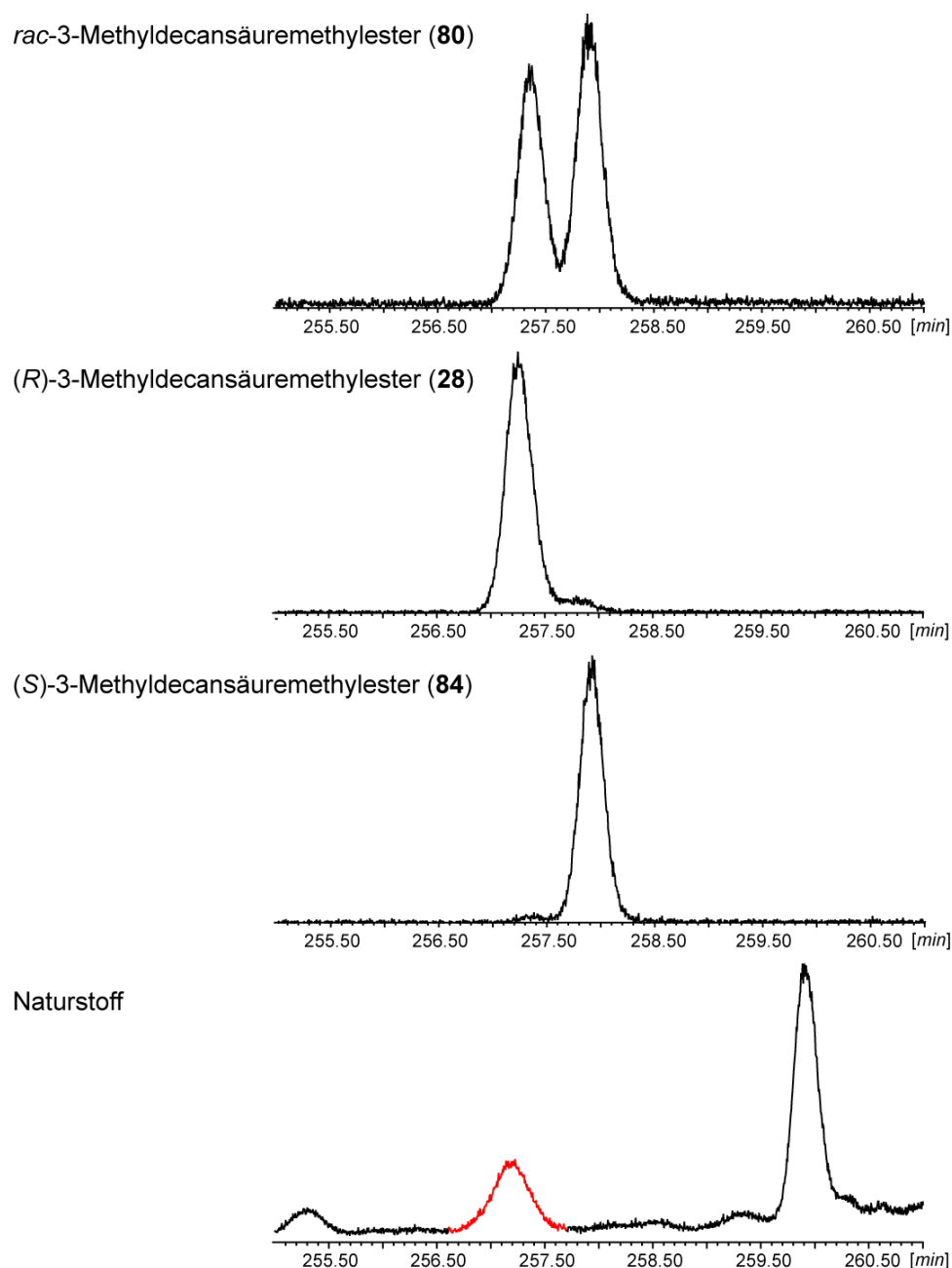


Abb. 35: Bestimmung der absoluten Konfiguration von 3-Methyldecansäuremethylester (**80**) aus den Urinextrakten von Katzen durch chirale GC. Die Identität der Peaks wurde durch Massenspektrometrie bewiesen.

Die Biotests der (*R*)- und (*S*)-3-Methyldecansäure (**85**, **86**) mit den Katzen ergaben keinen Unterschied in der Reaktion. Bei beiden zeigten zwei von fünf Katzen das Flehmenverhalten. Dies war überraschend, da in den natürlichen Urinfraktionen nur das (*R*)-Enantiomer **85** vorkam.

3.3.4 3,9-Dimethyldecansäure (**87**)

Wie in dem vorherigen Kapitel 3.3.3 schon beschrieben, sollte die Struktur eines β -methylverzweigten Methylesters aufgeklärt werden, dessen Massenspektrum nahezu identisch zu dem des 3-Methylundecansäuremethylesters (**29**) war. Die Retentionsindices unterschieden sich jedoch deutlich voneinander. Da zusätzliche ω -1 oder ω -2 Methylverzweigungen so gut wie nicht im Massenspektrum zu erkennen sind, wurde ein in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes Inkrementsystem zur Berechnung von Retentionsindices herangezogen.^[73] Die Berechnung erfolgte nach Gleichung (1) mit *N* als Anzahl der längste C-Kette mal hundert, *FG* als Inkrement für die funktionelle Gruppe und *Me_i* als Inkrement für jede Methylverzweigung abhängig zu der Position relativ zum Ende der C-Kette. *S* ist ein sterisches Inkrement für dimethylverzweigte Verbindungen, welches für 1,5-dimethylverzweigte Verbindungen mit 5 bestimmt wurde. Das funktionelle Gruppen Inkrement (*FG*) ist für Methylester 331, berechnet von dem Retentionsindex von 1331 für Decansäuremethylester (**24**).^[74]

$$I_c = N + FG + \sum Me_i - \sum S \quad (1)$$

Für 3,9-Dimethyldecansäuremethylester (**81**) wurde der Retentionsindex von $R_{\text{ber}} = 1424$ wie folgt berechnet:

$$1424 = 1000 + 331 + 33 + 60$$

$$N = 10 \times 100$$

$$FG = 331$$

$$Me_i = 33 (\omega - 7)$$

$$Me_i = 60 (\omega - 1)$$

Der berechnete Retentionsindex von $R_{\text{ber}} = 1424$ stimmte mit dem Retentionsindex des Naturstoffs (**31**) $R_{\text{nat}} = 1424$ genau überein.

Zur Bestätigung der vorgeschlagenen Struktur sollte 3,9-Dimethyldecansäure (**87**) synthetisiert werden. Im ersten Schritt wurde dafür 4-Methyl-1-pentanol (**88**) in das korrespondierende Alkylbromid **89** überführt.^[75] Dessen Grignard Reagenz reagierte mit Methylacrylat in einer MICHAEL-Addition zu 7-Methyloctansäuremethylester (**90**).^[68] Reduktion mit DIBAL-H führte zum Aldehyd **91**.^[76] Dieser reagierte mit (Methoxycarbonylmethylen)-triphenylphosphoran in einer WITTIG-Reaktion zu 9-Methyl-2-decensäuremethylester (**92**).^[67] Die Einführung der Methylgruppe in β -Position erfolgte in einer kupferkatalysierten MICHAEL-Addition und lieferte den gewünschten Ester **81**.^[68] Zum Schluss wurde der Ester **81** zu 3,9-Dimethyldecansäure (**87**) verseift (Abb. 36).^[69]

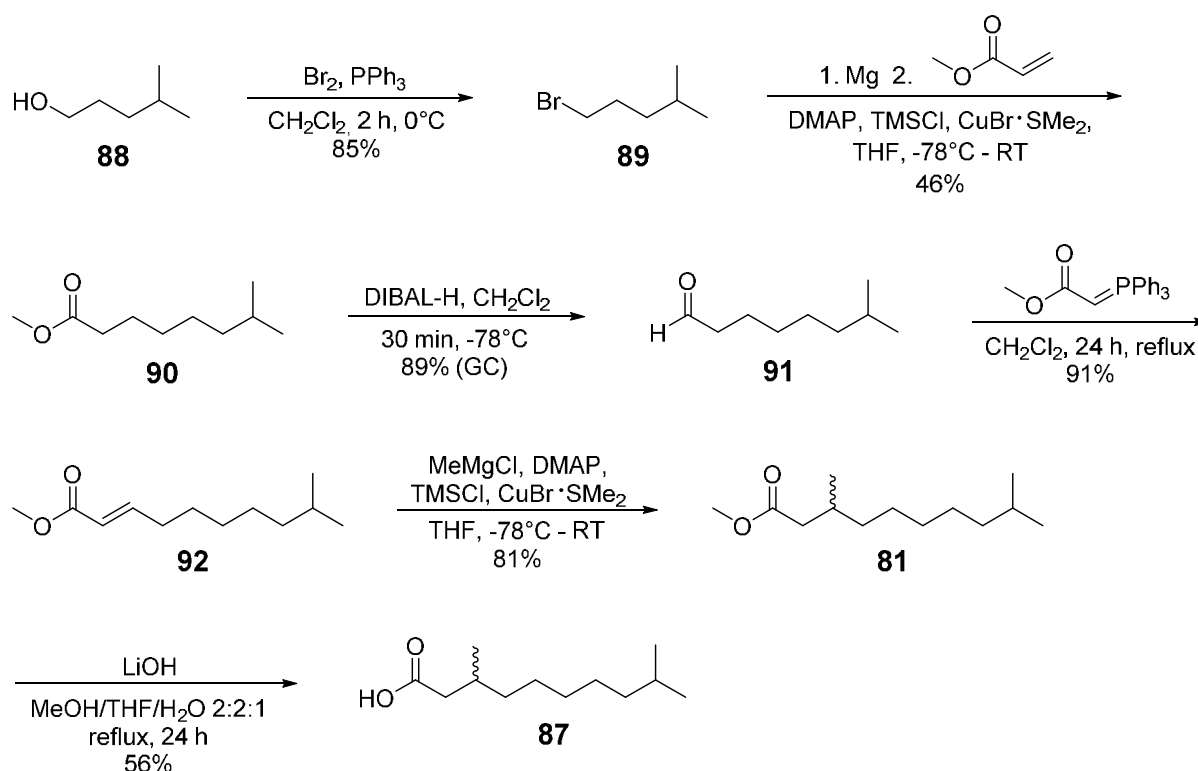


Abb. 36: Synthese von 3,9-Dimethyldecansäure (**87**).

Das Massenspektrum der neu synthetisierten Verbindung **81** wurde anschließend mit dem Massenspektrum der in dem Naturextrakt vorkommenden unbekannten Methyl-esters **31** verglichen (Abb. 37). Beide Massenspektren und ihre Retentionsindices erwiesen sich als identisch. Damit konnte der Strukturvorschlag bewiesen werden.

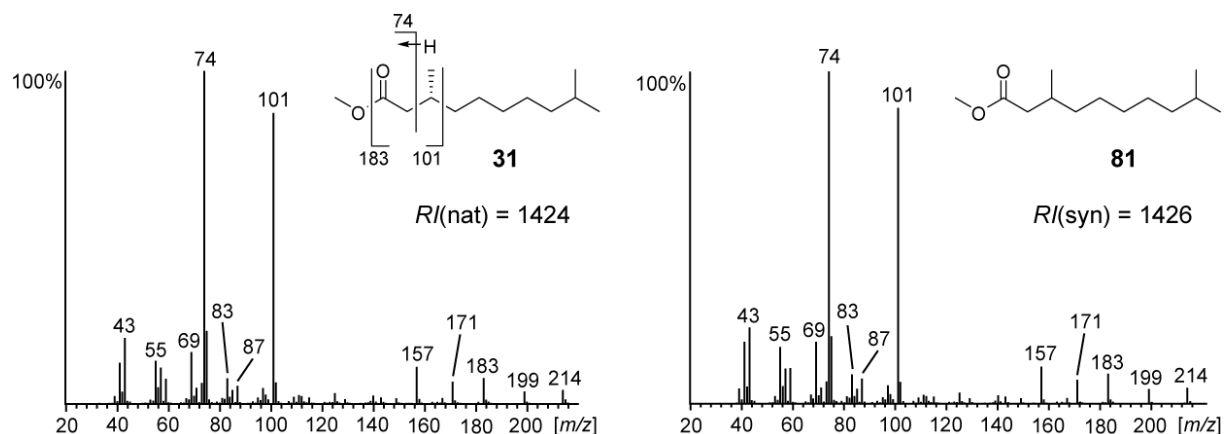


Abb. 37: Massenspektren des Naturstoffs (links) und des synthetisierten 3,9-Dimethyldecansäuremethylesters (**81**) (rechts).

Mit der synthetisierten 3,9-Dimethyldecansäure (**87**) wurden von der Arbeitsgruppe MIYAZAKI in Japan Biotests mit Katzen durchgeführt. Eine von drei Katzen zeigte bei dem Test das Flehmenverhalten. Das heißt, dass die Schnüffelzeit und die wiederholte Anzahl an Flehmen geringer war als bei den flehmenaktiven Fraktionen. Trotzdem besteht weiterhin die Möglichkeit, dass 3,9-Dimethyldecansäure (**87**) eine der flehmenauslösenden Verbindungen ist.

Sehr wahrscheinlich handelt es sich um eine Mischung aus verschiedenen verzweigten Fettsäuren wie 3-Methyldecansäure (**43**) und 3,9-Dimethyldecansäure (**87**) und unverzweigten Fettsäuren, die dieses Verhalten hervorrufen. Um die absolute Konfiguration von **81** aufzuklären und die Enantiomere mit den Katzen testen zu können sollte eine stereoselektive Synthese erfolgen. Die ersten vier Syntheseschritte bis zu dem 9-Methyl-2-decensäuremethylester (**92**) waren identisch zu der Synthese der racemischen 3,9-Dimethyldecansäure (**87**). Wie schon bei der stereoselektiven Synthese von (*R*)- und (*S*)-3-Methyldecansäure (**85**, **86**) wurde für die Einführung der Me-

thylgruppe in β -Position wieder die chiralen Kupferkatalysatoren (*R*)- und (*S*)-Tol-BI-NAP (**82**, **83**) eingesetzt.^[70] Anschließend erfolgte die Verseifung zu (*R*)- bzw. (*S*)-3,9-Dimethyldecansäure (**94**, **95**) (Abb. 38).^[69]

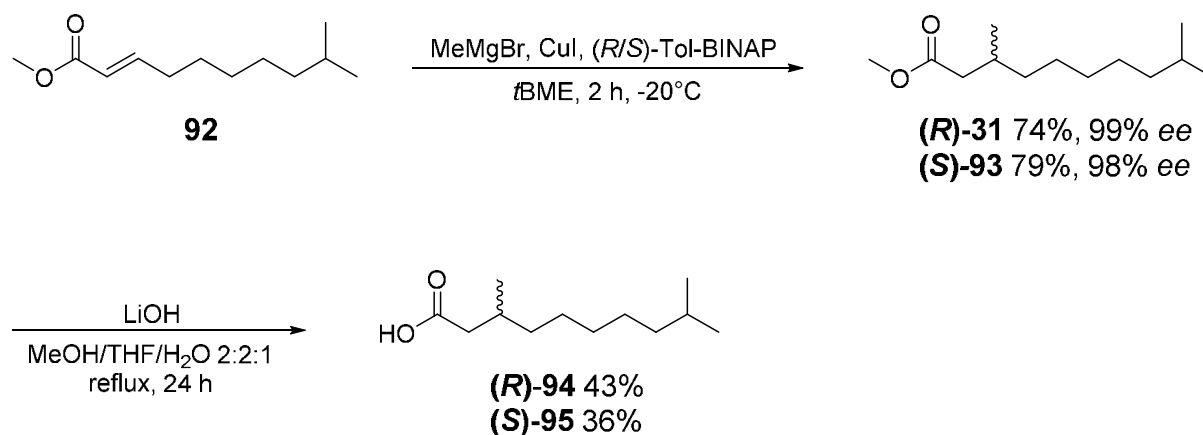
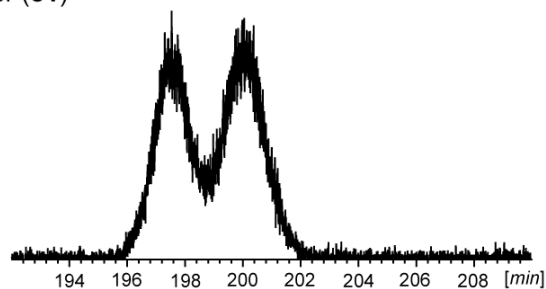


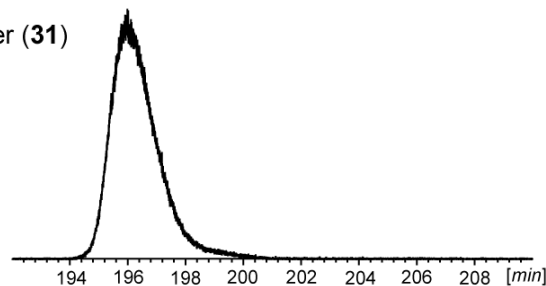
Abb. 38: Synthese von (*R*)-3,9-Dimethyldecansäure (**94**) und (*S*)-3,9-Dimethyldecansäure (**95**).

Um die absolute Konfiguration des Naturstoffs zu bestimmen, wurden gaschromatographische Untersuchungen an chiraler Phase durchgeführt. Für das Racemat des 3,9-Dimethyldecansäuremethylesters (**81**) wurde zunächst eine Methode für die Trennung auf einer chiralen Hydrodex-6-TBDMS-Phase (25 m) entwickelt. Eine akzeptable Trennung konnte durch die Verwendung eines isothermen Temperaturprogramms bei 70°C für 300 min erreicht werden (300 min bei 70°C, dann 2°C/min auf 105°C, dann 25°C/min auf 220°C). Anschließend wurden die synthetisierten Enantiomere und abschließend der Naturstoff einzeln mit demselben Temperaturprogramm vermessen (Abb. 39). Hierbei zeigten das (*R*)-Enantiomer **31** und der Naturstoff ein Peaktailling, das vermutlich von der unterschiedlichen Probenkonzentration zwischen Racemat **81**, (*R*)-Enantiomer **31** und Naturstoff herrührte. Der Vergleich der Enantiomere des 3,9-Dimethyldecansäuremethylesters (**R-31**, **S-93**) mit dem Urinextrakt der Katzen ergab, dass es sich bei der natürlich vorkommenden Säure um die (*R*)-3,9-Dimethyldecansäure (**94**) handelte. Damit zeigte sich, dass beide Verbindungen, die das Flehmenverhalten auslösen können, (*R*)-konfiguriert sind.

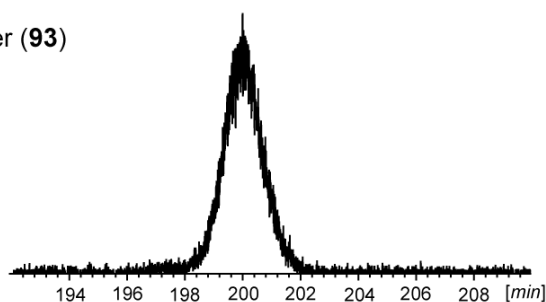
rac-3,9-Dimethyldecansäuremethylester (**81**)



(*R*)-3,9-Dimethyldecansäuremethylester (**31**)



(*S*)-3,9-Dimethyldecansäuremethylester (**93**)



Naturstoff

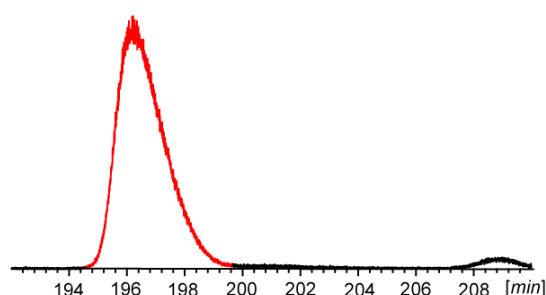


Abb. 39: Bestimmung der absoluten Konfiguration von 3,9-Dimethyldecansäuremethylester (**81**) aus dem Urinextrakten von Katzen durch chirale GC. Die Identität der Peaks wurde durch Massenspektrometrie bewiesen.

Die Biotests von (*R*)- und (*S*)-3,9-Dimethyldecansäure (**94**, **95**) mit den Katzen ergaben keinen Unterschied in der Reaktion. Bei beiden Enantiomeren zeigten zwei von fünf Katzen das Flehmenverhalten. Obwohl der natürliche Urinextrakt nur (*R*)-3,9-Dimethyldecansäure (**94**) aufwies, war das Resultat vergleichbar zu den Biotests mit (*R*)- und (*S*)-3-Methyldecansäure (**85**, **86**). Basierend auf der Beobachtung scheint die Selektivität des Rezeptors im vomeronasal Organ nicht hoch genug zu sein, um zwischen der unterschiedlichen Stereochemie zu differenzieren.

3.3.5 (*E*)-2-Ethyl-2-octensäure (96)

Befindet sich bei einem Methylester eine Ethylverzweigung in α -Position werden die typischen Fragmentationen $m/z = 102$ ($M^+ - CH=C(CH_2CH_3)_2$) durch die McLafferty Umlagerung und $m/z = 115$ ($M^+ - CH(CH_2CH_3)_2$) durch eine γ -Bindungsspaltung gebildet. Letzteres stellte bei dem (*E*)-2-Ethyl-2-octensäuremethylester (**32**) sogar den Basepeak dar (Abb. 40). Die γ -Bindungsspaltung schien hier also im Gegensatz zu (*E*)-2,4-Diethyl-2-hexensäuremethylester (**47**) deutlich bevorzugt zu werden. Vermutlich weil keine zweite Ethylverzweigung vorhanden ist. Weitere typische Ionen waren $M^+ - 31$ ($m/z = 153$) für die Abspaltung der Methoxygruppe und $M^+ - 29$ ($m/z = 155$) für die Abspaltung der Ethylgruppe. Die Position der Doppelbindung wurde in α -Position vermutet, da sich DMDS bei der in der Masterarbeit durchgeführten Derivatisierung nicht an die Doppelbindung addiert hatte.^[48] Um den Strukturvorschlag und die Stereochemie durch Vergleich von Massenspektren und Retentionsindices zu verifizieren, sollte die Verbindung **96** synthetisiert werden.

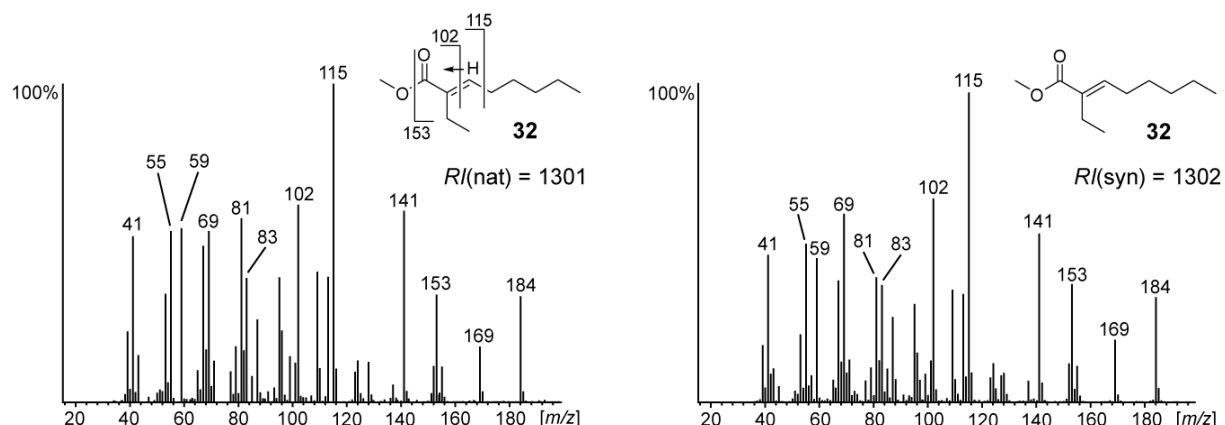


Abb. 40: Massenspektren des Naturstoffs (links) und des synthetisierten (*E*)-2-Ethyl-2-octensäuremethylesters (**32**) (rechts).

Zur stereoselektiven Darstellung von (*E*)-2-Ethyl-2-octensäure (**96**) wurde zunächst das Phosphonat **98** durch eine MICHAELIS-ARBUSOW-Reaktion aus 2-Brombutansäuremethylester (**97**) hergestellt.^[77] Dieses wurde anschließend mit Hexanal (**99**) in einer HORNER-WADSWORTH-EMMONS-Reaktion zu dem gewünschten Ester **32** umgesetzt.^{[78],[79]} Die *E*-Selektivität der HORNER-WADSWORTH-EMMONS-Reaktion ließ sich durch die Verwendung von KHMDS als Base erheblich steigern, wenn das Kation während der Reaktion durch 18-Krone-6 chelatisiert wurde.^[80] Unter diesen Bedingungen

wurde ein Diastereomerenverhältnis von $E/Z = 2.5:1$ erreicht, wodurch sich das reine E -Diastereomer bei der säulenchromatographischen Reinigung deutlich besser abtrennen ließ und in einer Ausbeute von 43% erhalten wurde. Der Ester **32** wurde im letzten Schritt mit einer Ausbeute von 83% zur gewünschten Säure **96** verseift.^[69]

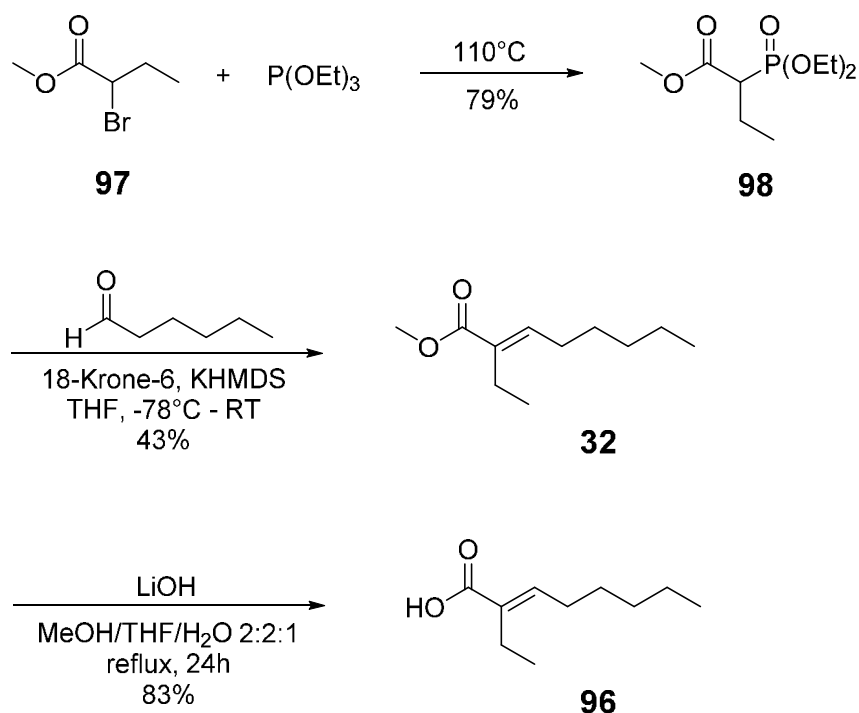


Abb. 41: Synthese von (E)-2-Ethyl-2-octensäure (**96**).

Der Vergleich der Massenspektren des Naturstoffs **32** und synthetisierten (E)-2-Ethyl-2-octensäuremethylester (**32**) zeigte, dass sie gut übereinstimmen, jedoch im kleineren Massenbereich leichte Unterschiede aufwiesen, wie zum Beispiel bei den Ionen $m/z = 59, 69$ und 81 (Abb. 40). Der Grund dafür war eine Überlagerung von dem Naturstoff mit einer weiteren Substanz. Mit Hilfe von Ionenspuren konnte zwar die zweite Verbindung zum Teil von dem TIC des Naturstoffs abgezogen werden, jedoch kam es dabei zur Intensitätsverschiebung der besagten Ionen. Dass es sich bei der synthetisierten Verbindung um den Naturstoff handelt, zeigte auch der Vergleich der Retentionsindices, die mit $R_{nat} = 1301$ für den Naturstoff und $R_{syn} = 1302$ für den synthetisierten Ester **32** sehr gut übereinstimmten.

Im Biotest löste (E)-2-Ethyl-2-octensäure (**96**) bei einer von fünf Katzen das gewünschte Flehmenverhalten aus.

3.3.6 (*E*)-2,4-Diethyl-2-hexensäure (72)

Genauso wie im Fall von (*E*)-2-Ethyl-2-octensäuremethylester (**32**) handelt es sich bei dem (*E*)-2,4-Diethyl-2-hexensäuremethylester (**47**) um einen in α -Position ethylverzweigten Fettsäuremethylester. Die beiden Ester besaßen auch das gleiche Molekülion $M^+ = 184$. Die Massenspektren wiesen aber klare Unterschiede auf. Zwar zeigten beide die für α -ethylverzweigte Methylester typischen Ionen $m/z = 102$ ($M^+ - CH = C(CH_2CH_3)_2$) und $m/z = 115$ ($M^+ - CH(CH_2CH_3)_2$). Im Fall von (*E*)-2,4-Diethyl-2-hexensäuremethylester (**47**) besitzen diese beiden Ionen aber eine geringere Intensität (Abb. 42). Offensichtlich wurden andere Ionen wie $m/z = 95$ bevorzugt gebildet. Weitere typische Ionen sind $M^+ - 31$ ($m/z = 153$) für die Abspaltung der Methoxygruppe und $M^+ - 29$ ($m/z = 155$) für die Abspaltung der Ethylgruppe. Die zweite Ethylgruppe in ω -2 Position ist nur an der hohen Intensität des Ions $m/z = 155$ zu erkennen. Die Position der Doppelbindung wurde in α -Position postuliert, da sich DMDS bei der in der Masterarbeit durchgeführten Derivatisierung nicht an die Doppelbindung addiert hat.^[48]

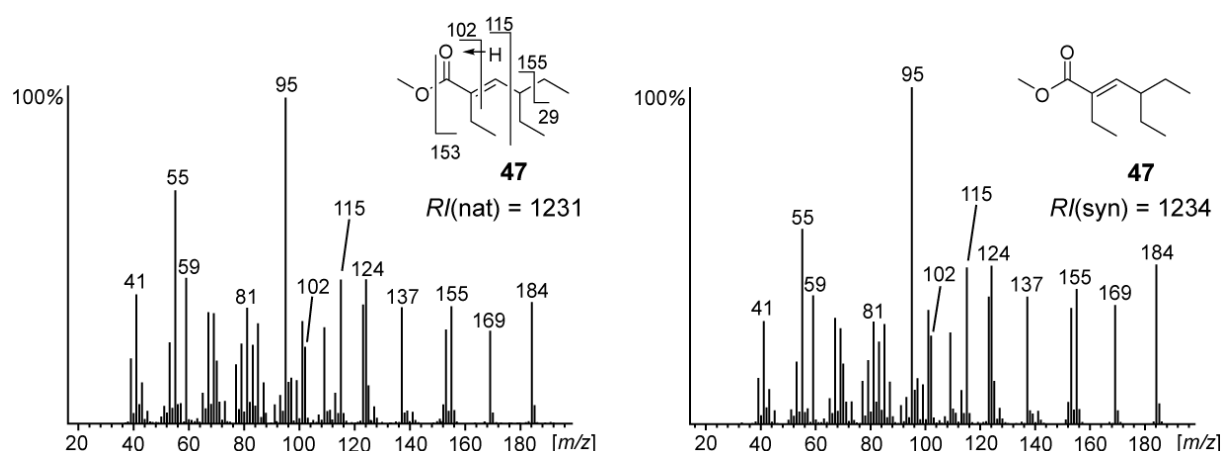


Abb. 42: Massenspektren des Naturstoffs (links) und des synthetisierten (*E*)-2,4-Diethyl-2-hexensäuremethylesters (**47**) (rechts).

Um den postulierten Strukturvorschlag und die Stereochemie durch Vergleich von Massenspektren und Retentionsindices zu verifizieren sollte die Verbindung **72** synthetisiert werden.

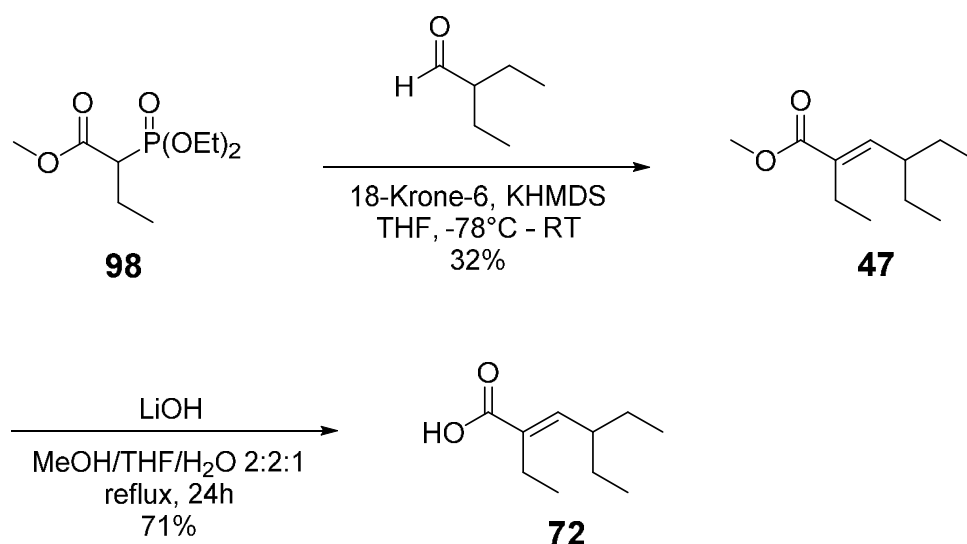


Abb. 43: Synthese von (*E*)-2,4-Diethyl-2-hexensäure (**72**).

Die stereoselektive Synthese erfolgte analog zu der von (*E*)-2-Ethyl-2-octensäure (**96**). Die HORNER-WADSWORTH-EMMONS-Reaktion wurde mit 2-Ethylbutanal und dem Phosphonat **98** durchgeführt (Abb. 43).^{[78],[79]} Auch hier führte die Verwendung von KHMDS als Base in Verbindung mit 18-Krone-6 zu einer deutlich höheren *E*-Selektivität der Reaktion (Diastereomerenverhältnis *E/Z* = 5:1). Bei einer Gesamtausbeute von 81% des *E/Z*-Gemisches konnten 32% davon als reines *E*-Diastereomer mittels säulenchromatographischer Reinigung gewonnen werden. Der Ester **47** wurde im letzten Schritt mit einer Ausbeute von 71% zur gewünschten Säure **72** verseift.^[69]

Der Vergleich der Massenspektren des Naturstoffs und synthetisierten (*E*)-2,4-Diethyl-2-hexensäuremethylester (**47**) zeigte, dass sie übereinstimmen (Abb. 42). Auch die Retentionsindices des Naturstoffs $RI_{\text{nat}} = 1231$ und des synthetisierten Esters **47** $RI_{\text{syn}} = 1234$ stimmten gut überein. Damit konnte die Struktur des Naturstoffs bestätigt werden.

Der Biotests löste die synthetisierten (*E*)-2,4-Diethyl-2-hexensäure (**72**) bei einer von fünf Katzen das gewünschte Flehmenverhalten aus.

3.3.7 4-Ethylhexadecansäure (73)

4-Ethylhexadecansäuremethylester (**36**) zeigte die typischen Fragmentationen für unverzweigte Methylester: $m/z = 74$ für die McLafferty Umlagerung, $m/z = 87$ für die γ -Bindungsspaltung und $m/z = 267$ ($M^+ - OCH_3$) für die Abspaltung der Methoxygruppe. An C₄-substituierte Methylester zeigen ein besonders intensives Ion $m/z = 87$, da ein stabiles sekundäres Radikal gebildet wird.^[66] Die Ethylverzweigung in γ -Position ist an den Ionen $m/z = 269$ ($M^+ - CH_2CH_3$) für die Abspaltung der Ethylgruppe, $m/z = 129$ für die δ -Spaltung zwischen C₄ und C₅ und $m/z = 227$ ($M^+ - 71$) für den Verlust von C₂-C₄ mit der Ethylgruppe und anschließender Rekombination der Reste zu erkennen.

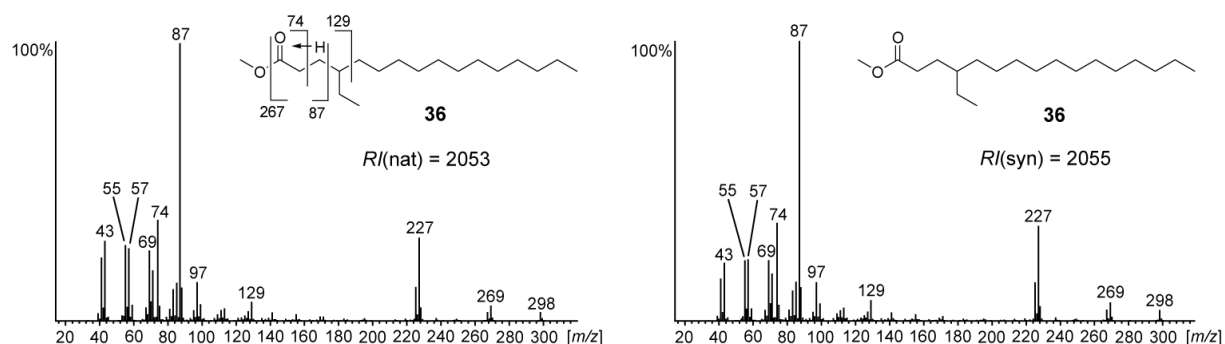


Abb. 44: Massenspektren des Naturstoffs (links) und des synthetisierten 4-Ethylhexadecansäuremethylesters (**36**) (rechts).

Zur Bestätigung der postulierten Struktur durch Vergleich von Massenspektren und Retentionsindices sollte die Verbindung **73** synthetisiert werden.

Im ersten Schritt der Synthese wurde zunächst Tetradecansäuremethylester (**35**) mit Hilfe von Kalium-*tert*-butanolat zum Tetradecansäure-*tert*-butylester (**100**) umgeestert (Abb. 45).^[81] Dieser deutlich sperrigere Ester sollte im nächsten Syntheseschritt eine claisenartige Selbstkondensation des Esters verhindern. Zur Unterbindung der Doppelalkylierung wurde LDA als sperrige Base eingesetzt. Trotz dieser Vorkehrungen ergab die Alkylierung zum 2-Ethyltetradecansäure-*tert*-butylester (**101**) nur eine Ausbeute von 35%.^[82] Im nächsten Schritt erfolgte die Reduktion des Esters **101** zum Alkohol **102** mit DIBAL.^[83] Der erhaltene Alkohol **102** wurde dann mit sehr guter Ausbeute in einer PARIKH-DOERING-Oxidation zum Aldehyd **103** umgewandelt.^[84] Die folgende WITTIG-Reaktion ergab 4-Ethyl-2-hexadecensäuremethylester (**104**) in gu-

ter Ausbeute.^[67] Das Alken **104** wurde anschließend mit Hilfe von Wasserstoff und Platin(IV)-oxid als Katalysator zu 4-Ethylhexadecansäuremethylester (**36**) hydriert.^[85] Im letzten Schritt erfolgt die Verseifung zur gewünschten 4-Ethylhexadecansäure (**73**).^[69]

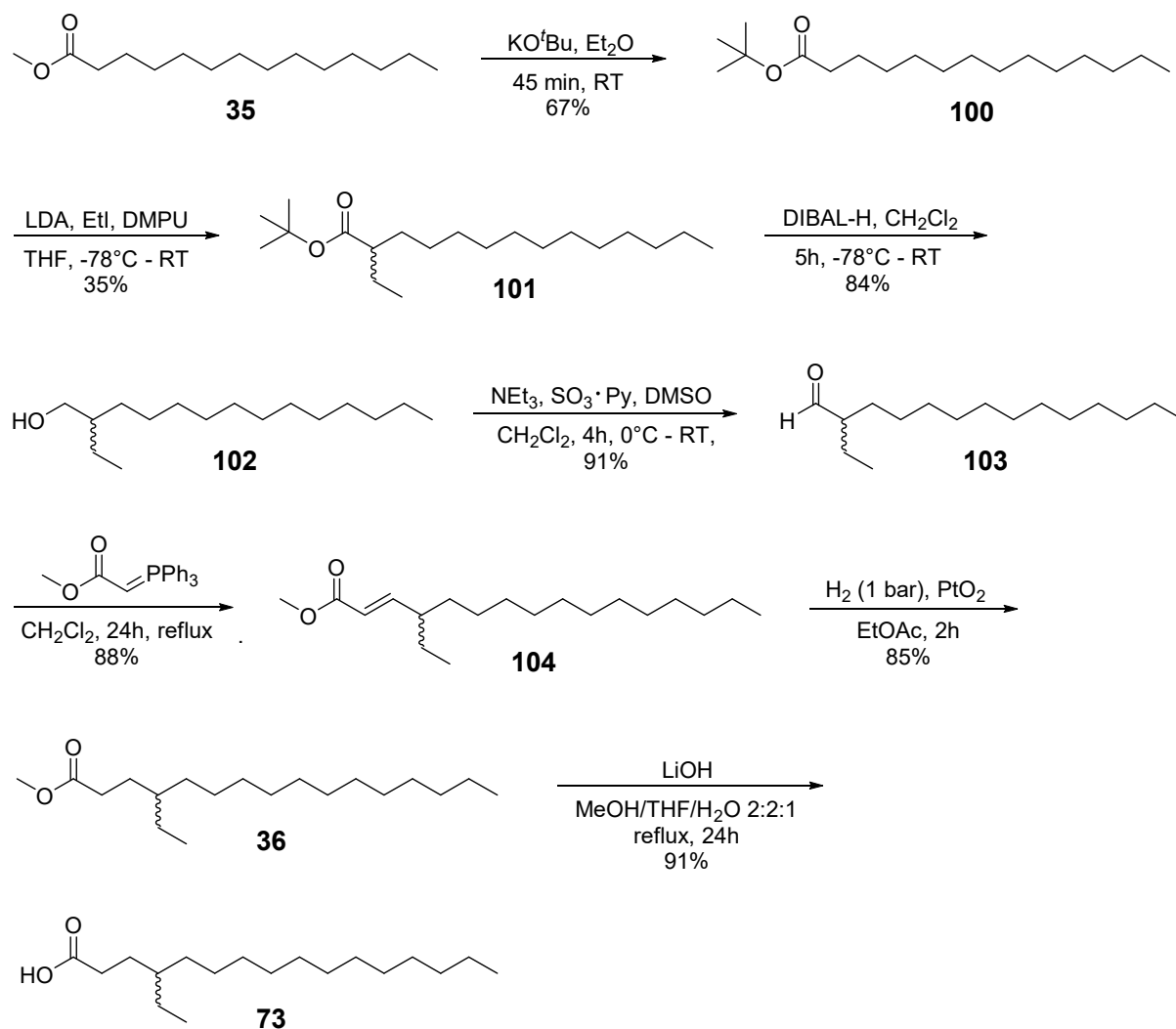


Abb. 45: Synthese von 4-Ethylhexadecansäure (**73**).

Das Massenspektrum der synthetisierten Verbindung **36** und das des Naturstoffs stimmten überein, genauso wie die Retentionsindices der Verbindungen (Abb. 44). Damit wurde der Strukturvorschlag für den Naturstoff bewiesen.

Auf eine enantioselektive Synthese wurde an dieser Stelle verzichtet, da sich die Verbindung **73** bei den Biotests als nicht flehmenaktiv herausstellte. Am HZI Saarbrücken

in der Arbeitsgruppe von Prof. Rolf Müller wurde die Verbindung **73** auf ihre antibiotische Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* getestet. Die Aktivität lag im Bereich von 4-16 µg/mL.

3.3.8 Individuelle Erkennung in Katzen

Die Biotests mit den synthetisierten Verbindungen zeigten, dass die einzelnen Verbindungen eine zwar flehmeninduzierende Wirkung besitzen, der Effekt aber nicht so stark ausgeprägt ist wie der einzelner Fraktionen. Aus diesem Grund wird eine Mischung aus verschiedenen verzweigten Fettsäuren wie (*R*)-3-Methyldecansäure (**85**) und (*R*)-3,9-Dimethyldecansäure (**94**) und anderen unverzweigten Fettsäuren benötigt, wie sie auch in den flehmenaktiven Fraktionen vorkommt. MIYAZAKI *et al.* testete deshalb eine Mischung aus 3-Methyldecansäure (**43**), 3,9-Dimethyldecansäure (**87**) und 3-Methyldodecansäure (**45**) im Verhältnis 1:37:5. Dies entsprach dem natürlichen Verhältnis in den flehmenaktiven Fraktionen. Zwei von vier Katzen zeigten das Flehmenverhalten bei dieser Mischung von Fettsäuren. Sehr wahrscheinlich fehlten in der Mischung noch weitere Verbindungen, um dieselbe Intensität des Verhaltens im Vergleich zu dem natürlichen Extrakt hervorzurufen. Auch andere verzweigte Fettsäuren könnten eine Rolle dabei spielen. Nur weil sie als individuell getestete Substanz kein Flehmen hervorgerufen haben, ist nicht auszuschließen, dass sie in einer Mischung nicht trotzdem flehmenaktiv sein könnten. Ein weiterer Grund für die nur schwache flehmeninduzierende Wirkung der Mischung könnten auch die fehlenden unverzweigten Fettsäuren sein. MIYAZAKI *et al.* fand bei weiteren GC/MS Untersuchungen heraus, dass Katzen, ähnlich wie bei ihren Analsacksekreten und beim Kot, die Zusammensetzung der verzweigten und unverzweigten Fettsäuren von Tier zu Tier variiert. Habituation-Dishabituation-Tests mit Urin und mit den Fettsäurefraktionen zeigten, dass die Katzen sowohl zwischen dem Urin von unterschiedlichen Katzen unterscheiden können als auch zwischen den Fettsäurefraktionen von unterschiedlichen Katzen. Des Weiteren testete MIYAZAKI *et al.* ob sich die Zusammensetzung des Urins bzw. der Fettsäuren über die Zeit veränderte. Die Fettsäuremischungen blieben in ihrer Zusammensetzung konstant. Die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen ließen den Schluss zu, dass die verzweigten und unverzweigten Fettsäuren im Urin den Katzen zur individuellen Erkennung dienen. Der große Unterschied zu den individuellen chemischen Profilen bei den Analsacksekreten und dem Kot liegt in den neu identifizierten verzweigten Fettsäuren.

4 Analyse von Urinextrakten von Mausmakis

4.1 Einleitung

Mausmakis (*Microcebus*) gehören zu der Gruppe der Lemuren und sind auf Madagaskar beheimatet. 1992 waren nur zwei Arten Mausmakis bekannt, heutzutage sind es 24 Arten, die über ganz Madagaskar verteilt in den Wäldern leben (Abb. 46).^{[86],[87]}

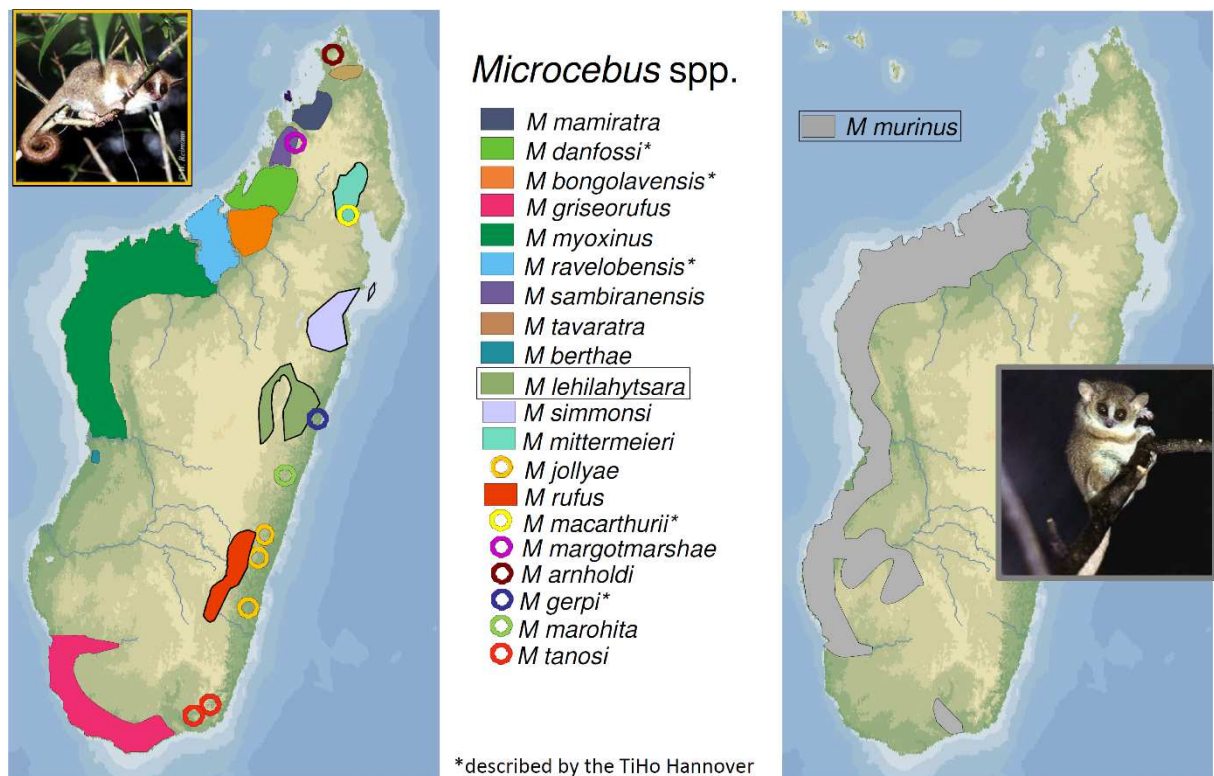


Abb. 46: Lebensraum der einzelnen Mausmakiarten auf Madagaskar.^{[86],[87]}

Die hier untersuchten Arten sind markiert.

Mausmakis gehören mit einer Körpergröße von 9 bis 15 cm (Kopfrumpflänge) und einem Körpergewicht von 30 bis 80 g zu den kleinsten Primaten der Welt.^{[87],[88]} Kennzeichnend sind nicht nur ihre geringe Größe, sondern auch ihr langer Schwanz, der genauso lang ist wie ihr Körper, ihre großen Augen zum stereoskopischen Sehen, große bewegliche Ohren, ein Nasenspiegel, Hände und Füße mit Nägeln und einer Putzkralle. Mausmakis sind Allesfresser und ernähren sich z. B. von Früchten, Insekten, Blüten, Nektar und Blättern.^{[86],[89]} Die ausschließlich nachtaktiven Tiere^[90] leben

vorwiegend auf Bäumen und schlafen tagsüber in selbst errichteten runden Blätternestern oder Baumhöhlen, die regelmäßig gewechselt werden.^{[91],[92]} Ob sie dabei in Gruppen zusammen schlafen oder allein ist von Art zu Art unterschiedlich.^{[86],[93]} Zwei Arten des Torpors (Ruhezeit) sind bei Mausmakis bekannt, der tägliche und der jahreszeitliche Torpor. Der tägliche Torpor dient dem Energiemanagement, während der jahreszeitliche Torpor in der Trockenzeit zwischen ca. April/Mai bis September/Oktober den Mausmakis hilft, die Zeit der knappen Nahrungsressourcen zu überleben.^{[94],[93]} Dabei werden Körpertemperatur und Stoffwechselrate abgesenkt. Dieser Schlafzustand kann einige Wochen andauern. Nach welchem Muster Mausmakis in den Torpor gehen ist bisher noch nicht bekannt. Sie legen sich dazu Fettreserven im Schwanz an, die über die Zeit der Nahrungsknappheit abgebaut werden.

Die Paarungszeit wird bei Mausmakis durch die jahreszeitliche Änderung der Länge des Tageslichts eingeleitet.^[95] Sie beginnt kurz nach Ende der Trockenzeit ca. im September und dauert bis ca. Januar an. In dieser Zeit können die Weibchen in Durchschnitt zwei Zyklen haben.^{[86],[96]} Die Weibchen sind nur für eine Nacht in einem Zeitraum von ca. 2-4 Stunden fruchtbar.^{[97],[98]} In dieser Zeit paaren sie sich bis zu elfmal mit verschiedenen Männchen.^{[99],[100]} Die Männchen formen vor der Paarungszeit Dominanzhierarchien, was dazu führt, dass dominante Männchen einen höheren Fortpflanzungserfolg haben.^{[101],[102]} Da die Weibchen in vielen Arten der Mausmakis dominant gegenüber den Männchen sind, können sie sich die Partner zur Paarung aussuchen.^{[103],[104]} Nach rund 60-tägiger Tragzeit kommen meist zwei Jungtiere zur Welt. Die Aufzucht der Jungen wird ausschließlich von der Mutter übernommen. Mit zwei Monaten werden die Jungen unabhängig von der Mutter.^[93]

Zur intraspezifischen Kommunikation nutzen Mausmakis zum einen Laute und zum anderen chemische Signalstoffe. Mausmakis haben eine breite und sehr empfindliche Hörweite von 0.8-50 kHz.^[105] Diese nutzen sie für sieben oder acht verschiedene Arten an Rufen.^[106] Es gibt zum Beispiel die Warnrufe vor Fressfeinden, drohende Rufe gegen Fressfeinde, Paarungsrufe zur Partnerfindung und Paarungsbereitschaft, Rufe zur Wiedervereinigung der Schlafgruppen, sowie Rufe zur Wiedervereinigung von Mutter und Kind.^{[107],[108],[109]}

Es ist bekannt, dass neben der akustischen die chemische, olfaktorische Kommunikation für Mausmakis von großer Bedeutung ist.^[110] Wie auch von anderen Säugetieren

bekannt, werden wichtige chemische Signale in Speichel, Urin, Kot und Genitalsekreten eingebunden. Mausmakis nutzen diese Möglichkeiten um verschiedene Informationen wie ihre Identität, sexuelle Anziehung, Alarmsignale und möglicherweise territorial Markierung zu übermitteln.^{[110],[111]} Weibchen im Östrus beispielsweise zeigen ein gesteigertes anogenital Markierungsverhalten, um ihre Artgenossen möglicherweise auf ihren Fruchtbarkeitsstatus aufmerksam zu machen.^[109] Außerdem verwenden Mausmakis das Mund wischen (mouth wiping)^[109] und Urin waschen (urine washing)^[111], um ihre Schlafplätze am Abend beim Verlassen zu markieren, wahrscheinlich, um sie am Morgen wiederzufinden und anderen Gruppen zu signalisieren, wem dieser Schlafplatz gehört.^[108] Zur Detektion der chemischen Signale nutzen sie den Hauptriechkolben (MOB) und das vomeronasal Organ (VNO), das bei Mausmakis besonders entwickelt und empfindlich ist.^[112] Jedoch zeigen sie kein Flehmenverhalten.^[113]

Eines der wichtigsten Medien zur chemischen Kommunikation ist der Urin. Dominante Männchen können z.B. ein Pheromon mit dem Urin abgeben, das einen inhibierenden Effekt auf die Reproduktionsfunktion von Artgenossen hat. Dieses Pheromon, vermutlich ein Steroid, führt zu einer Abnahme des Plasmatestosteronspiegels in subdominanten Männchen.^[114] Auf der anderen Seite steigt der Testosteronspiegel von Männchen deutlich an, wenn sie dem preöstrus Urin von Weibchen ausgesetzt werden.^[115]



Abb. 47: Grauer Mausmaki (*Microcebus murinus*) (links) und Goodman Mausmaki (*Microcebus lehilahytsara*) (rechts) [Fotos: Annika Kollikowski, TiHo Hannover].

Bisher ist nur wenig über die Verbindungen im Urin von Mausmakis bekannt und welche weiteren Funktionen die Urinmarkierungen haben. Aus diesem Grund sollten im Rahmen dieser Arbeit der Urin von zwei nahe verwandten Mausmakiarten, dem grauen Mausmaki (*Microcebus murinus*) und dem Goodman Mausmaki (*Microcebus lehilahytsara*) (Abb. 47), untersucht und verglichen werden. Der graue Mausmaki lebt in dem trockenen Laubwald, der sich von Südwesten bis nach Nordwesten erstreckt^[116], während der Goodman Mausmaki im östlichen immergrünen Gebirgswald von Madagaskar lebt.^{[117],[118]} Bis zu zwei Mausmakiarten können in den verschiedenen Wäldern von Madagaskar nebeneinander leben. In Zusammenarbeit mit Frau Prof. RADESPIEL, von der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, sollte untersucht werden, ob sich die beiden Arten in der chemischen Zusammensetzung ihres Urins unterscheiden und die Urinmarkierung so eventuell zur Artenunterscheidung dient. Außerdem sollte die Frage geklärt werden, ob es signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung des Urins von Männchen und Weibchen gibt, die zur Unterscheidung der Geschlechter dienen könnte.

4.2 Methodenentwicklung

Zunächst sollte eine Methode etabliert werden, wie Verbindungen am besten aus dem Urin extrahiert werden könnten, um sie anschließend mittels GC/MS zu analysieren. Dafür wurden drei verschiedene Methoden zur Extraktion getestet. Als erstes wurde SPME (Solid Phase Micro Extraction) von dem Headspace des Urins zur Extraktion untersucht. Hierfür wurde der Urin in einem geschlossenen Analysenfläschchen mit Septumdeckel auf 40°C erwärmt, währenddessen wurden die flüchtigen Verbindungen im Gasraum (Headspace) direkt über dem Urin mit der SPME Faser extrahiert und anschließend im Injektor des GC/MS desorbiert und analysiert. Im Gasraum entsteht eine Verteilung der Verbindungen zwischen Gasphase und dem Polymer auf der SPME Nadel. Die zweite Methode zur Extraktion des Urins war SPME direkt vom Urin. Dabei tauchte die SPME Faser in den Urin ein und wurde anschließend mittels GC/MS desorbiert und analysiert. Die dritte Methode war im Gegensatz zu den ersten beiden keine Festphasenextraktion, sondern eine flüssig-flüssig Extraktion des Urins mit Dichlormethan und anschließender Analyse mittels GC/MS.

In Abbildung 48 sind die Totalionenstromchromatogramme (TIC) der drei verschiedenen Extraktionsmethoden zum Vergleich dargestellt. Der Vergleich zeigt, dass die beiden SPME Methoden mehr Artefakte, z.B. Siloxane, im TIC aufweisen als die Extraktion mit Dichlormethan. Dies lag unter anderem an der SPME Faser, die aus 100 µm Polydimethylsiloxan (PDMS) besteht und die durch die Hitze im Injektor des GC/MS zum Teil mit den zu analysierenden Verbindungen desorbiert wurden. Dies führte dazu, dass einige Verbindungen von Siloxanen überlagert wurden, wodurch sie schlecht oder gar nicht zu identifizieren waren. Ein weiterer Nachteil der SPME Extraktionen war die geringe Konzentration der Verbindungen im TIC, dadurch wurden sie zum Teil von anderen Verbindungen überlagert oder lagen unterhalb der Detektionsgrenze. Im Gegensatz dazu war die Konzentration der Verbindungen bei dem Dichlormethanextrakt deutlich höher als bei den SPME Methoden. Bei dem Vergleich der Methoden fiel insbesondere die unterschiedliche Anzahl an detektierten Verbindungen auf. Die geringste Anzahl wies die Headspace SPME Extraktion auf, gefolgt von der SPME Extraktion direkt vom Urin, die höchste Anzahl an Verbindungen zeigte der Dichlormethanextrakt. Die SPME Methoden extrahierten nur die leicht flüchtigen Verbindungen aus dem Urin, wodurch die Anzahl der Verbindungen geringer als bei dem Dichlormethanextrakt war, der auch die schwerer flüchtigen Verbindungen erfasste. Denn auch diese können olfaktorische Signalmoleküle sein. Zwar entscheidet bei der SPME Methode die Wahl der Faser, welche Verbindungen extrahiert werden, jedoch wird trotzdem nur ein kleiner Ausschnitt an Verbindungen des Urins sichtbar. Der Dichlormethanextrakt hat den Vorteil, dass die Menge an Verbindungen deutlich größer und hinsichtlich ihrer Polarität differenzierter ist. Aus den oben genannten Gründen wurde entschieden für die restlichen Urinproben die dritte Extraktionsmethode mit Dichlormethan zu verwenden.

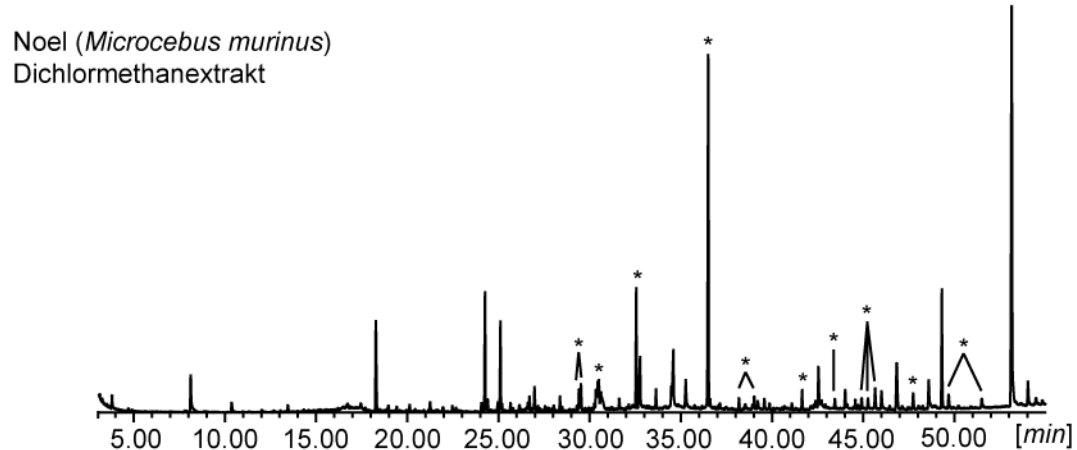
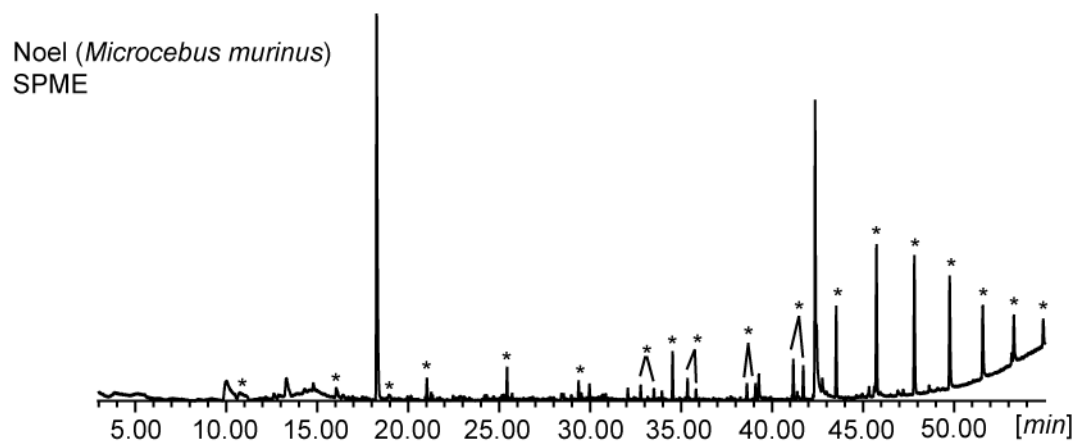
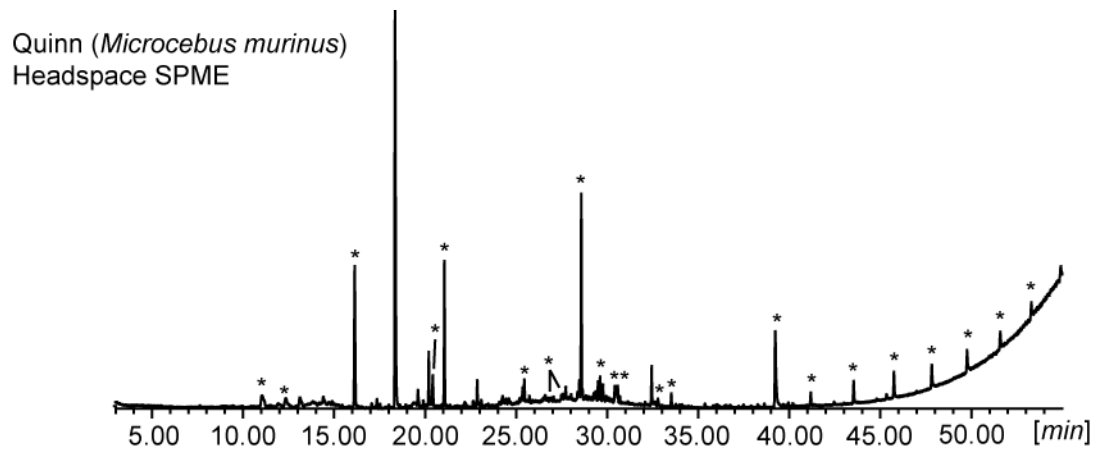


Abb. 48: TICs der drei verschiedenen Extraktionsmethoden des Urins im Vergleich: Head-space SPME (oben), SPME direkt vom Urin (Mitte) und Dichlormethanextrakt (unten). Artefakte sind mit * gekennzeichnet.

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 Hauptkomponenten

Insgesamt wurden 22 Urinprobenextrakte von neun *M. murinus* (vier Männchen, fünf Weibchen) und neun *M. lehilahytsara* (drei Männchen, sechs Weibchen) mittels GC/MS untersucht. Dabei wurden 1321 verschiedene flüchtige Verbindungen gefunden, wovon 477 (36%) Verbindungen identifiziert werden konnten. Eine Liste der Verbindungen findet sich auf der der Arbeit beiliegenden CD. Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte durch Vergleich von Massenspektren und Retentionsindices mit Datenbank- und Literaturwerten. Die bekannten Verbindungen gehörten den unterschiedlichsten Stoffklassen an, einschließlich Alkoholen, Aldehyden, Amiden, Ketonen, (Fett-) Säuren, Estern, Terpenen, Steroiden und Heterozyklen wie Lactone, Indole oder Chinoline. Damit zeigten die Urinextrakte der Mausmakis eine hohe Strukturvielfalt. Außerdem unterschieden sich die Urinextrakte zum Teil erheblich voneinander. Diese Unterschiede lagen in der Anzahl der gefundenen Verbindungen, der Art der Verbindungen und der relativen Konzentration der Verbindungen. Diese unterschied sich von Probe zu Probe stark voneinander. Dennoch gab es neun Hauptkomponenten, die die höchsten relativen Konzentrationen in den meisten Proben aufwiesen, welche in Tabelle 6 aufgeführt sind.

Tab. 6: Hauptkomponenten mit der höchsten relativen Konzentration in den meisten Proben.

Verbindung ^[a]	RT [min]	RI ^[b]	RI [Lit] ^[c]
Dimethylsulfon (105)	7.72	923	919
Chinolin (106)	17.92	1234	1233
Unbekannt M: 208 (109, 123, 82) (107)	23.83	1454	
Unbekannt M: 206 (108, 150, 93) (108)	24.70	1490	
Unbekannt (137, 183, 165)	31.19	1777	
Octadecenamid (109)	41.82	2356	
Squalan (110)	46.43	2655	
Squalen (111)	48.86	2828	2848
Cholesterol (112)	52.62	3117	

[a] Bei unbekannten Verbindungen sind die größten Fragmentationen in Klammern angegeben

[b] Der Retentionsindex *I* wurde anhand der homologen Reihe der Alkane nach Van den Dool und Kratz bestimmt.

Die im Mausmakiurin gefundenen neun Hauptkomponenten sind keine ungewöhnlichen Verbindungen für Urinproben. Dimethylsulfon (**105**) und Chinolin (**106**) sind typische Abbauprodukte im Urin, genauso wie die Verbindungen **107** und **108**, die sehr wahrscheinlich Carotinoid-Abbauprodukte sind. Dimethylsulfon (**105**) entsteht durch den Abbau von Dimethylsulfoxid (**129**), kommt aber auch natürlich in vielen tierischen und pflanzlichen Organismen vor.^[119] Chinolin (**106**) kommt als Grundgerüst in vielen Naturstoffen vor.^[120] Squalan (**110**) und Squalen (**111**) sind zwei Verbindungen, die natürlich auf der Haut vorkommen, aber auch in der Nahrung zu finden sind.^[121] Cholesterol (**112**) ist ein wichtiger Bestandteil der Zellmembran und dient als Vorstufe für Steroidhormone und Gallensäuren im Körper.^[122] Chinolin (**106**), Squalen (**111**) und Cholesterol (**112**) wurden unter anderem auch schon in den Kotextrakten vom wilden iberischen Wolf (*Canis lupus signatus*)^[123] und im Urin und den Analdrüsensekreten vom afrikanischen Wildhund (*Lycaon pictus*)^[59] gefunden.

Neben den Hauptkomponenten zeigte der weitere Vergleich der Urinextrakte auch noch 56 Verbindungen, die in über 82% der Urinextrakte zu finden waren (Tab. 7). Diese Verbindungen waren daher in fast jedem Urinextrakt präsent. Sie gehören sehr unterschiedlichen Verbindungsklassen an, darunter z.B. Alkoholen, Aldehyden, Fettsäuren, Ketonen, Estern und Amiden. Neben den 42 bekannten Verbindungen wurden außerdem 14 unbekannte Verbindungen gefunden, deren Struktur in keiner der verwendeten Datenbanken hinterlegt war.

Tab. 7: Verbindungen, die am häufigsten in den Urinproben vorkamen.

X/Y: Vorkommen in X von Y Urinproben.

Verbindungen ^[a]	RI ^[b]	RI [Lit] ^[c]	<i>M. murinus</i>	<i>M. lehilahytsara</i>
2-Methylpropylacetat	801		10/11	8/11
4-Hydroxy-2-pentanone	831	849	11/11	10/11
Dimethylsulfon (105)	929	919	11/11	11/11
Cyclohexanon (113)	933		9/11	9/11
Benzaldehyd (114)	962	961	9/11	11/11
Phenol (115)	988	992	11/11	11/11
Unbekannt M: 112 (43, 87, 58)	1016		9/11	10/11

Benzylalkohol (120)	1037	1036	10/11	9/11
2-Phenylacetaldehyd (118)	1044	1044	9/11	9/11
5-Ethylidihydro-2(3 <i>H</i>)-furanon (119)	1058	1056	11/11	7/11
Acetophenon (116)	1067	1065	11/11	11/11
4-Methylphenol (117)	1079	1075	11/11	11/11
Nonanal (75)	1105	1102	11/11	11/11
1-Phenyl-2-propanon	1126	1124	10/11	9/11
2,6,6-Trimethyl-2-cyclohexene-1,4-dion	1142	1142	11/11	10/11
2-Piperidinon	1173	1174	9/11	10/11
Octansäure	1181	1182	11/11	11/11
Decanal (76)	1206	1206	9/11	9/11
2-Aminobenzaldehyd oder <i>N</i> -Phenyl-formamid	1216		10/11	10/11
Chinolin (106)	1234	1233	11/11	11/11
Nonansäure	1274	1272	10/11	11/11
Indol	1295	1293	11/11	10/11
2-Aminoacetophenon	1301	1315	11/11	11/11
1,2,3,4-Tetrahydrochinolin	1329	1327	10/11	11/11
Decansäure	1369	1368	10/11	9/11
Unbekannt (Carotenoid Ab- bauprodukt) M: 208 (109, 123, 82) (105)	1454		11/11	11/11
1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-ethanon	1488		10/11	11/11
Unbekannt M: 206 (108, 150, 93) (108)	1490		11/11	11/11
2-Methyl-1,4-naphthalendion	1512		8/11	11/11
Unbekannt M: 206 (150, 79, 108)	1558		11/11	11/11
Unbekannt M: 222 (108, 43, 150)	1570		11/11	9/11
Unbekannt M: 194 (151, 110, 152)	1597		9/11	10/11
3-Hydroxy- β -damascon	1616	1627	8/11	10/11
Unbekannt M: 222 (192, 43, 180)	1630		11/11	11/11
Unbekannt M: 206 (111, 168, 125)	1733		7/11	11/11
Tetradecansäure	1759	1759	10/11	8/11
Isochinolin-1-carboxamid	1771		10/11	10/11

Unbekannt M: 206 (132, 122, 79)	1798		10/11	9/11
1-Hexadecanol	1880	1882	11/11	11/11
Unbekannt M: 213 (132, 117, 176)	1897		10/11	10/11
Hexadecansäuremethylester (26)	1922	1926	9/11	9/11
Unbekannt (268, 55, 158)	1946		9/11	9/11
1-Octadecanol	2083	2082	10/11	9/11
1-Nonadecanol	2195	2181	10/11	9/11
Nonadecansäuremethylester (69)	2225	2221	10/11	11/11
Unbekannt (138, 99, 165)	2262		11/11	7/11
Octadecanamid	2382	2398	11/11	9/11
Tetracosan	2399	2400	11/11	10/11
Pentacosan	2498	2500	9/11	10/11
Squalan (110)	2653		11/11	11/11
Heptacosan	2698	2700	10/11	10/11
Octadecansäureoctylester	2704		11/11	10/11
Docosenamid	2778		9/11	10/11
Squalen (111)	2830	2848	11/11	11/11
Cholesterol (112)	3125		11/11	11/11
Unbekannt (57, 111, 71)	3193		10/11	10/11

[a] Bei unbekannten Verbindungen sind die größten Fragmentationen in Klammern angegeben

[b] Der Retentionsindex / wurde anhand der homologen Reihe der Alkane nach Van den Dool und Kratz bestimmt.

[c] Entnommen aus NIST Chemistry WebBook^[49].

Die große Anzahl an Verbindungen (n = 56), die in fast jedem Urinextrakt vorhanden waren, deutet auf das Potential von Urin als Geruchsmarkierung von *Microcebus* spp. hin. Es gab bisher nur eine Studie, die die flüchtigen Verbindungen aus Urin von zwölf Mausmakiarten, die die meisten Familien der Feuchtnasenprimaten repräsentieren, untersuchte und miteinander unter dem Aspekt von sozial-ökologischen und phylogenetischen Mustern bei olfaktorischen Signalen verglich. Zur Untersuchung der flüchtigen Headspace Verbindungen verwendete DELBARCO-TRILLO *et al.* die SPDE-GC/MS Technik.^[124] Wahrscheinlich fand die Studie aus diesem Grund nur 33 Verbindungen als größte Anzahl an Verbindungen in einer Urinprobe von einer Mausmakiart. Genauso wie in den hier untersuchten Urinextrakten von *M. murinus* und *M. lehilahytsara*

wurden Benzaldehyd (**114**), Nonanal (**75**) und Decanal (**76**) auch in der Studie von DELBARCO-TRILLO *et al.* in fast jeder Urinprobe gefunden.^[124] In dem Headspace des Urins von *Cheirogaleus medius*, dem einzigen untersuchten Vertreter der Familie der Katzenmakis (Cheirogaleidae), zu denen auch *M. murinus* und *M. lehilahytsara* gehören, wurden von DELBARCO-TRILLO *et al.* nur 15 Verbindungen nachgewiesen.^[124] Von diesen wurden fünf (4-Heptanon (**12**), 2-Heptanon (**11**), Benzaldehyd (**114**), 4-Nonanon (**16**), Decanal (**76**)) auch in den Urinextrakten von *M. murinus* und *M. lehilahytsara* gefunden, aber nur Benzaldehyd (**114**) und Decanal (**76**) kamen in fast jeder Probe vor.

Im Allgemeinen handelt es sich bei den häufig vorkommenden Verbindungen um Verbindungen, die zum großen Teil auch schon bei anderen Säugetieren im Urin, Kot oder Geruchsmarkierungen gefunden wurden. Phenol (**115**), Acetophenon (**116**), Decanal (**76**) und Benzaldehyd (**114**) wurden beispielsweise auch im Urin von männlichen Elefanten (*Elephas maximus*)^[125], Geparden (*Acinonyx jubatus*)^[126] und männlichen Ratten^[127] nachgewiesen. Außerdem kommen 4-Methylphenol (**117**) und Cyclohexanon (**113**) in großen Mengen in den Schläfendrüsensekreten von männlichen Elefanten in der Musth vor und könnten somit potentielle Botenstoffe sein.^[125] Große Überschneidungen von den im Mausmaki Urin häufig vorkommenden Verbindungen, vor allem bei den Fettsäuren und Alkoholen, gibt es mit den Verbindungen, die in dem Kot und Urin von afrikanischen Wildhunden (*Lycaon pictus*)^[59], in dem Kot von iberischen Wölfen (*Canis lupus signatus*)^[123] und im Urin von Königstigern (*Panthera tigris*)^[58] identifiziert werden konnten. Eine weitere große Übereinstimmung gibt es mit den Headspace Verbindungen, vor allem mit den Aldehyden, aus Kot und Urin von weiblichen braunen Ratten (*Rattus norvegicus*).^[15] Aber auch Verbindungen wie 2-Phenylacetaldehyd (**118**), 5-Ethyldihydro-2(3*H*)-furanon (**119**), Benzylalkohol (**120**), Dimethylsulfon (**105**), Phenol (**115**) und 4-Methylphenol (**117**) traten sowohl bei den Mausmakis als auch bei den braunen Ratten (*Rattus norvegicus*) auf.^[15]

4.3.2 Unterschiede zwischen den Geschlechtern

Im Rahmen dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob Männchen und Weibchen eine chemische Signatur im Urin besitzen, wodurch sie sich unterscheiden und so ihr Geschlecht anderen über den Urin mitteilen können. Dazu wurden zehn männliche und

zwölf weibliche Urinextrakte beider Arten in Hinblick auf die Unterschiede der flüchtigen Verbindungen ($RI < 2000$) analysiert. Die Einschränkung auf die flüchtigen Verbindungen mit einem Retentionsindex unter 2000 wurde vorgenommen, da sich die Unterschiede im chemischen Profil vermutlich in diesem Bereich zeigen, wie Studien bei anderen Lemuren z.B. *Lemur catta* gezeigt haben.^[128] Außerdem wurde die Komplexität der statistischen Analyse durch eine geringere Verbindungsanzahl reduziert.

Durchschnittlich wurden 173 Verbindungen mit einem RI unter 2000 in den Urinextrakten gefunden. Nicht mitberücksichtigt wurden Verbindungen, die nur in einer Probe vorkamen. Die Anzahl an Verbindungen bei den Männchen lag dabei mit 145 unter dem Durchschnitt. Im Gegensatz dazu wurden mit 195 eine überdurchschnittliche Anzahl an Verbindungen bei den Weibchen gefunden. Ein T-Test für separate Varianzen, durchgeführt von Frau Prof. RADESPIEL, zeigte dass diese Unterschiede bei den Geschlechtern signifikant sind ($p = 0.03$, $N_{\text{male}} = 10$, $N_{\text{female}} = 12$). Dabei zeigten die Männchen eine größere Varianz bei der Anzahl an Verbindungen als die Weibchen, wie auch in dem Box & Whisker Plot in Abbildung 49 zu erkennen ist.

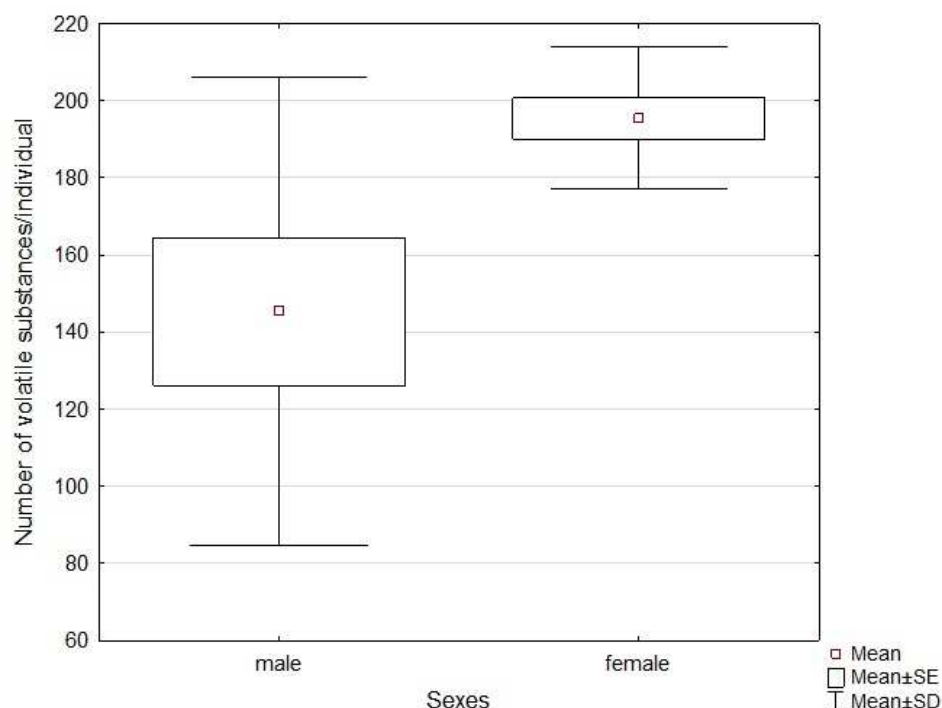


Abb. 49: Box & Whisker Plot [Prof. RADESPIEL]: Durchschnittlich wurden 173 Verbindungen in den Urinextrakten gefunden. Die durchschnittliche Anzahl an Verbindungen war bei den Männchen 145 und bei den Weibchen 195.

Bei dem Vergleich der Totalionenstromchromatogramme (TICs) von Männchen und Weibchen fällt außerdem auf, dass die Konzentration an flüchtigen Verbindungen bei den Weibchen häufig höher ist als bei den Männchen (Abb. 50).

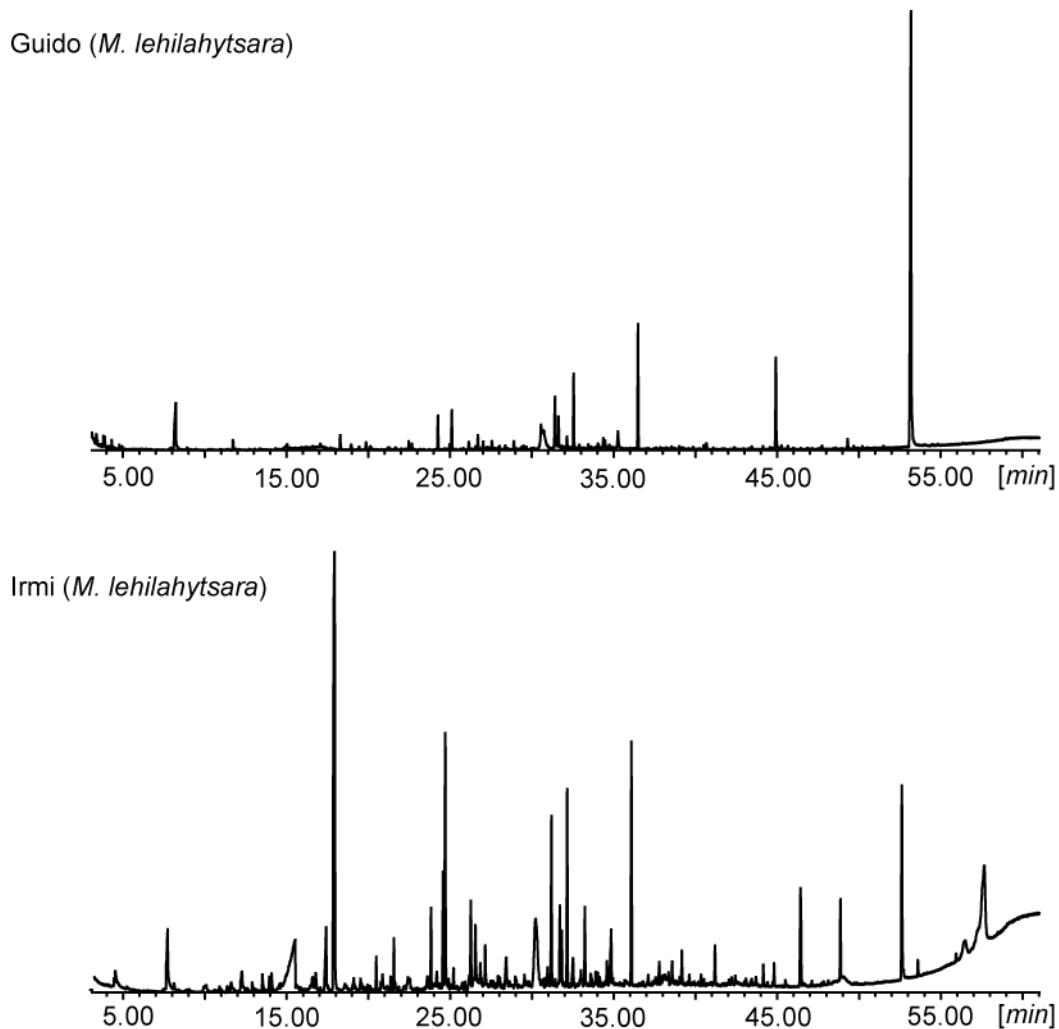


Abb. 50: Totalionenstromchromatogramme von einem Männchen (oben) und einem Weibchen (unten) der Art *Microcebus lehilahytsara* im Vergleich.

Generell war bei den männlichen und weiblichen Urinextrakten keine Verbindung dabei, die in jeder Probe von einem Geschlecht vorhanden und bei dem anderen Geschlecht abwesend war. Jedoch zeigte die Diskriminanzanalyse (DFA), basierend auf den ersten 15 Hauptkomponenten, einen deutlich signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern (Wilks' $\lambda = 0.04290$, $F_{10,11} = 24.539$, $P < 0.000001$). Zehn von diesen 15 Faktoren (1, 3, 5, 10, 12, 2, 13, 14, 4, 8) wurden in die Diskriminanzfunktion mit integriert, mit sechs Faktoren (1, 3, 5, 10, 12, 2), die signifikant beitrugen. Folglich

ordnete diese Diskriminanzfunktion alle Urinextrakte dem korrekten Geschlecht zu. Die Faktorladungen auf dem ersten und einflussreichsten Faktor (Faktor 1) zeigten fünf Verbindungen, die entscheidend zu dem spezifischen Urinprofil der Männchen beitrugen (Tab. 8). Bei den fünf Verbindungen handelte es sich um Benzylacetat (**121**), Benzylpropionat (**122**) und drei unbekannte Verbindungen **U1**, **U2** und **U3**. Davon waren vier Verbindungen spezifisch für die Männchen, nur die unbekannte Verbindung **U1** kam auch vereinzelt bei den Weibchen vor.

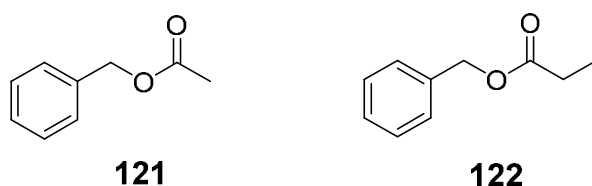


Abb. 51: Identifizierte spezifische Verbindungen der Männchen.

Benzylacetat (**121**) kommt natürlich in vielen Früchten, Pilzen, Blumen und deren Ölen vor und ist außerdem bisher vor allem als Lockstoff und Pheromon bei Insekten wie Käfern (*Coleoptera*) und Hautflüglern (*Hymenoptera*) bekannt.^[129] Männliche Prachtbienen (*Euglossini*) beispielsweise werden von bestimmten Verbindungen und Mischungen, die Benzylacetat (**121**) enthalten, selektiv angelockt.^[130]

Tab. 8: Verbindungen der Urinprofile von männlichen und weiblichen Mausmakis. Verbindungen im oberen Teil sind spezifisch für die Männchen, die spezifischen Verbindungen für die Weibchen sind im unteren Teil aufgeführt.

Verbindungen ^[a]	<i>RI</i> ^[b]	<i>RI</i> [Lit] ^[c]	Männchen	Weibchen
Benzylacetat (121)	1164	1165	3	0
Benzylpropionat (122)	1257	1257	4	0
Unbekannt M: 222 (165, 150, 109) (U1)	1634		8	2
Unbekannt (105, 160 149) (U2)	1698		3	0
Unbekannt (43, 99, 71) (U3)	1708		3	0
Dimethylsulfoxid (129)	845	830	3	10
Allylthiocyanat (130)	884	890	3	7
Cyclohexanon (113)	934	894	6	12
Hexansäure (123)	988	981	3	12

Limonen (127)	1026	1030	6	11
2-Ethylhexan-1-ol (131)	1030	1029	5	12
Benzylalkohol (120)	1034	1036	8	12
2-Phenylacetaldehyd (118)	1044	1044	6	12
S-Methyl-methansulfonothioat (132)	1063	1066	2	11
4-Nonanon (16)	1071	1053	3	8
Unbekannt (83, 85, 146) (U4)	1072		3	11
Heptansäure (124)	1085	1080	2	10
Unbekannt (84, 69, 112) (U5)	1107		2	9
3,5,5-Trimethylhexansäure (133)	1147		1	7
4-Methyl-5,6-dihydro-2 <i>H</i> -pyran-2-on (134)	1158	1169	3	9
5-Methyl-2-(propan-2-yl)-cyclohexan-1-ol (Menthol) (135)	1171	1188	5	11
2,5-Dihydrothiophen (136)	1194		4	7
3-Methyl-4-vinyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2,5-dion (137)	1257	1261	5	10
2-Methylchinolin (128)	1302		1	10
Unbekannt (147, 146, 119) (U6)	1307		3	11
8-Hydroxychinolin (138)	1352	1358	1	11
Unbekannt (134, 106, 149) (U7)	1391		3	8
Tetradecan (139)	1398	1400	4	12
Unbekannt (68, 41, 81) (U8)	1440		4	8
Unbekannt (133, 104, 105) (U9)	1466		6	10
Unbekannt (137, 166, 68) (U10)	1496		3	8
δ-Cardinen (140)	1528	1528	6	11
Unbekannt M. 224 (71, 57, 85) (U11)	1540		6	12
Dodecansäure (125)	1562		5	12
Unbekannt (82, 55, 41) (U12)	1583		3	5
Unbekannt M: 222 (150, 125, 137) (U13)	1630		4	10
1-Tetradecanol (126)	1675		5	12
Unbekannt (72, 99, 179) (U14)	1677		3	4
Unbekannt (71, 57, 85) (U15)	1707		6	12
Unbekannt M: 208 (190, 147, 161) (U16)	1880		2	6
Hexadecansäuremethylester (26)	1923		6	12
Unbekannt (57, 71, 83) (U17)	1933		5	10
Unbekannt (55, 268, 158) (U18)	1945		6	12
Unbekannt (57, 71, 85) (U19)	1951		4	12
Unbekannt (71, 57, 85) (U20)	1963		5	12
Unbekannt (157, 154, 77) (U21)	1973		5	12

[a] Bei unbekannten Verbindungen sind die größten Fragmentationen in Klammern angegeben

[b] Der Retentionsindex / wurde anhand der homologen Reihe der Alkane nach Van den Dool und Kratz bestimmt.

[c] Entnommen aus NIST Chemistry WebBook^[49].

Im Gegensatz zu den Männchen wurden bei den Weibchen 42 Verbindungen gefunden, die charakteristisch für das Urinprofil sind (Tab. 8). Alle Verbindungen wurden auch im Urin der Männchen gefunden, jedoch überwiegte die Anzahl deutlich bei den Weibchen. Von den 42 Verbindungen konnten 23 Verbindungen identifiziert werden, diese gehören verschiedensten Verbindungsklassen an, unter anderem kurzkettigen Alkoholen, Fettsäuren und Estern. Die restlichen 19 Verbindungen waren unbekannte Verbindungen, die in den Datenbanken nicht hinterlegt waren. Einige der Verbindungen, die in Tabelle 8 aufgeführt sind, sind schon von anderen Säugetieren bekannt. Hexansäure (**123**) wurde zum Beispiel in den Drüsensekreten von *Lemur Catta*^[131] und Mandrill (*Mandrillus sphinx*)^[132], sowie im Urin von männlichen Ratten, männlichen Königstigern (*Panthera tigris*)^[58], afrikanischen Wildhunden (*Lycaon pictus*)^[59] und iberischen Wölfen (*Canis lupus signatus*)^[123] gefunden. Heptansäure (**124**), Dodecansäure (**125**) und 1-Tetradecanol (**126**) wurden im Urin von männlichen Königstigern (*Panthera tigris*)^[58] und im Kot von afrikanischen Wildhunden (*Lycaon pictus*)^[59] nachgewiesen. Außerdem konnte Dodecansäure (**125**) in den labialen Drüsensekreten von *Lemur Catta*^[128] und den Duftmarken von weiblichen Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*)^[133] identifiziert werden. Limonen (**127**) hingegen ist vor allem als Allomon, Pheromon und Lockstoff bei Insekten bekannt^[134], kommt aber auch, genauso wie 4-Nonanon (**16**), im Urin von Feuchtnasenprimaten^[124], im Urin vom Vielfraß (*Gulo gulo*)^[135] und im Kot und Urin von männlichen braunen Ratten (*Rattus norvegicus*)^[15] vor. Im Urin vom Großen Panda (*Ailuropoda melanoleuca*)^[136] konnten die Verbindungen 2-Phenylacetaldehyd (**118**), Hexansäure (**123**) und Heptansäure (**124**) nachgewiesen werden. Sowohl im Urin als auch in den Analdrüsensekreten von Frettchen (*Mustela furo*) wurde 2-Methylchinolin (**128**) identifiziert.^[137]

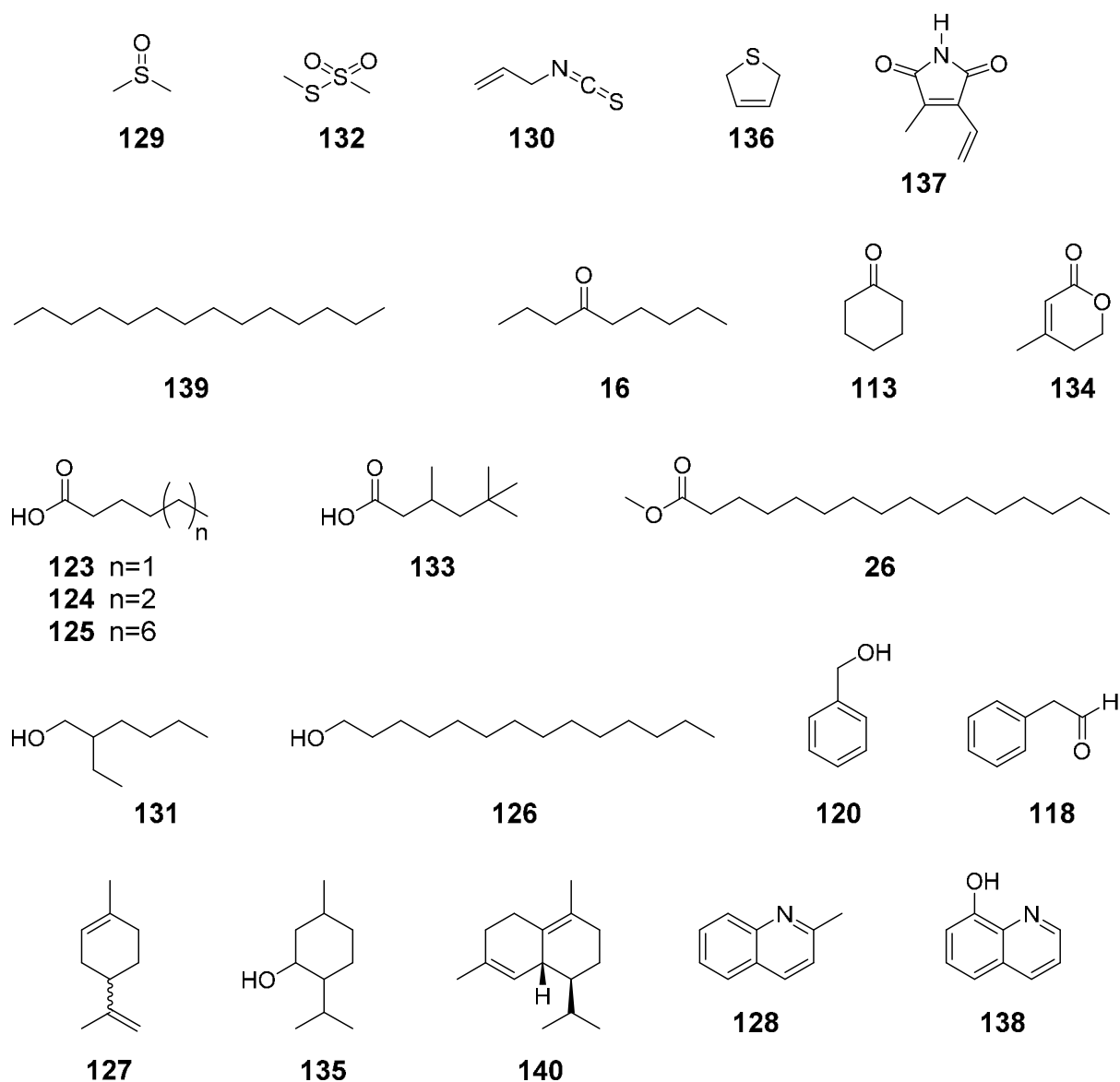


Abb. 52: Identifizierte spezifische Verbindungen der Weibchen.

Diese erheblichen Unterschiede zwischen den Geschlechtern könnten physiologisch begründet sein. Möglicherweise teilen die Weibchen mehr Informationen über die Verbindungen im Urin mit als die Männchen und haben deswegen auch eine deutlich größere Anzahl an Verbindungen im Urin und in ihrem Urinprofil.

Die oben beschriebenen Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Ergebnissen von der Studie von DELBARCO-TRILLO *et al.*, die keine Unterschiede in der Anzahl von Verbindungen oder relativen Konzentration zwischen männlichen und weiblichen Feuchtnasenprimaten feststellen konnte.^[124] Die Gründe dafür könnten zum einen an der gerin-

gen Anzahl an untersuchten Proben und zum anderen an der geringen Anzahl an gefundenen Verbindungen durch die Headspace Methode liegen. Außerdem wurde der nächste Verwandte der Mausmakis, *Cheirogaleus medius*, unter diesem Aspekt nicht analysiert.

4.3.3 Unterschiede zwischen den Arten

Im Rahmen dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob die beiden Arten *M. murinus* und *M. lehilahytsara* eine chemische Signatur im Urin besitzen, wodurch sie sich unterscheiden und so ihre Zugehörigkeit zu einer Art Anderen über den Urin mitteilen können. Dazu wurden jeweils elf Urinextrakte der beiden Arten in Hinblick auf die Unterschiede der flüchtigen Verbindungen ($RI < 2000$) analysiert. Wie schon zuvor bei den Geschlechtern, gab es auch bei den Arten keine Verbindung, die im Urin der einen Art immer präsent war und bei der anderen nicht. Jedoch zeigte die Diskriminanzanalyse (DFA) basierend auf den ersten 15 Hauptkomponenten einen deutlich signifikanten Unterschied zwischen den Arten (Wilks' $\lambda = 0.11607$, $F_{7,14} = 15.230$, $p < 0.000001$). Sieben von diesen 15 Faktoren (2, 6, 5, 3, 10, 6, 15) wurden in die Diskriminanzfunktion mit integriert, mit vier Faktoren (1, 2, 3, 4) die signifikant beitrugen.

Alle Urinextrakte von *M. murinus* und *M. lehilahytsara* wurden von der Diskriminanzfunktion der korrekten Art zugeordnet. Die DFA zeigte 15 Verbindungen, die maßgeblich zu dem Faktor 2 beitrugen und damit charakteristisch für das Urinprofil von *M. murinus* waren (Tab. 9). Zehn dieser Verbindungen waren spezifisch für *M. murinus*, während die anderen fünf Verbindungen auch im Urin von *M. lehilahytsara* vorkamen, allerdings nur sehr vereinzelt. Neun der Fünfzehn Verbindungen konnten identifiziert werden und gehörten hauptsächlich den Stoffklassen der Ketone und aromatischen Amide an, wie z.B. 3-Octanon (**141**) und 2-Aminobenzamid (**142**). Desweiteren zeigte die DFA sieben Verbindungen, die eine sehr hohen negative Ladung auf dem Faktor 2 hatten und somit charakteristisch für das Urinprofil von *M. lehilahytsara* waren. Alle diese Verbindungen waren unbekannte Verbindungen, die in keiner Datenbank hinterlegt waren. Zwei dieser Verbindungen waren spezifisch für *M. lehilahytsara*, während die restlichen fünf Verbindungen in deutlich höherer Anzahl bei dieser Art gefunden wurde als bei *M. murinus* (Tab. 9).

Tab. 9: Verbindungen der Urinprofile von *M. murinus* und *M. lehilahytsara*. Verbindungen im oberen Teil sind spezifisch für *M. murinus*, die spezifischen Verbindungen für *M. lehilahytsara* sind im unteren Teil aufgeführt.

Verbindungen ^[a]	RI ^[b]	RI [Lit] ^[c]	<i>M. murinus</i>	<i>M. lehilahytsara</i>
5-Methyl-3-hexanon (143)	835		5	0
3-Octanon (141)	985	985	6	0
Trimethylpyrazin (144)	1004	1005	8	6
Unbekannt (59, 72, 100) (U23)	1113		6	0
1-Phenyl-1-butanon (145)	1251	1253	4	0
2,4-Dimethylchinazolin (146)	1386		7	3
Unbekannt (57, 71, 43) (U24)	1493		8	5
2-Aminobenzamid (142)	1525		4	0
4-Amino- <i>N</i> -ethylbenzamid (147)	1554		9	2
2-Amino- <i>N</i> -methylbenzamid (148)	1570		4	0
Unbekannt (85, 43,69) (U25)	1636		5	0
Unbekannt (59, 72, 112) (U26)	1657		9	0
Unbekannt (178, 136, 165) (U27)	1661		5	0
Unbekannt (71, 57 85) (U28)	1703		5	1
(4-Aminophenyl)-pyrrolidin-1-ylmethanon (149)	1868		4	0
Unbekannt (98, 101, 126) (U29)	1318		3	8
Unbekannt (84, 125, 55) (U30)	1342		0	5
Unbekannt (114, 59, 99) (U31)	1360		2	10
Unbekannt M: 208 (98, 139, 43) (U32)	1402		0	7
Unbekannt M: 224 (109, 123, 151) (U33)	1554		5	8
Unbekannt (138, 54, 127) (U34)	1582		5	10
Unbekannt M: 208 (137, 183, 125) (U35)	1803		1	7

[a] Bei unbekannten Verbindungen sind die größten Fragmentationen in Klammern angegeben

[b] Der Retentionsindex *I* wurde anhand der homologen Reihe der Alkane nach Van den Dool und Kratz bestimmt.

[c] Entnommen aus NIST Chemistry WebBook^[49].

Wie bereits beschrieben, zeigte die DFA 15 Verbindungen, die charakteristisch waren für das Urinprofil von *M. murinus*. Dabei überwogen zwei Verbindungsklassen, Ketone

und aromatische Amide. Einige der identifizierten Verbindungen sind als potentielle Botenstoffe bei anderen Säugetieren bekannt. Zum Beispiel wurde 3-Octanon (**141**) schon im Urin von dem Fingertier (*Daubentonia madagascariensis*)^[124] und in den Duftmarken vom Großen Panda (*Ailuropoda melanoleuca*)^[136] nachgewiesen. 5-Methyl-3-hexanon (**143**) wurde in den präorbital Drüsensekreten von Klippspringern (*Oreotragus oreotragus*)^[138] und Blauduckern (*Cephalophus monicola*)^[139] identifiziert. Trimethylpyrazin (**144**) wurde in den Duftmarken von weiblichen Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*)^[133], im Urin von Rotluchsen (*Lynx rufus*)^[140] und Mähnenwölfen (*Chrysocyon brachyurus*)^[141] gefunden. 2,4-Dimethylchinazolin (**146**) wurde in den dorsal patches von männlichen Curaçao Blütenfledermäusen (*Leptonycteris curasoae*) während der Paarungszeit identifiziert.^[142]

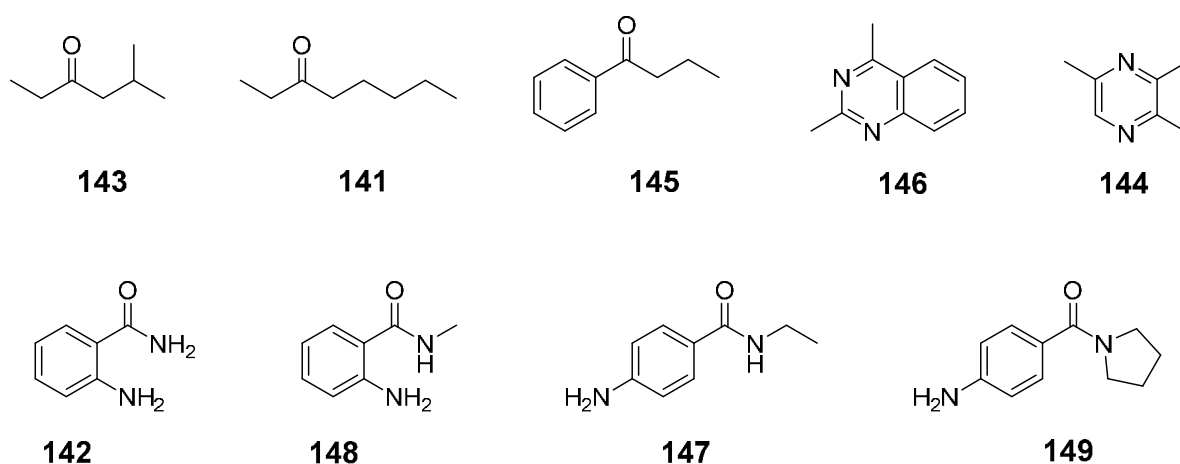


Abb. 53: Identifizierte spezifische Verbindungen von *M. murinus*.

4.3.4 Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mausmakis deutlich mehr flüchtige Verbindungen im Urin besitzen als ursprünglich angenommen und dabei eine beeindruckende Strukturvielfalt zeigen. Die große Anzahl an Verbindungen ist wahrscheinlich auch auf die gewählte Methodik der Dichlormethanextrakte zurückzuführen. Dies weist auf das hohe Potential der Lösungsmittelextraktion zur Identifizierung von Verbindungen und das Ermitteln von chemischen Profilen hin.

Obwohl die Urinproben von in Gefangenschaft lebenden Tieren stammen, die eine standardisierte Nahrung erhalten und unter denselben Bedingungen gehalten werden, konnte trotzdem in den Proben eine systematische Variation in der Zusammensetzung und relativen Konzentration der Verbindungen festgestellt werden. Nicht alle Unterschiede müssen zwangsläufig auf eine kommunikative Funktion hinweisen. Dies liegt schon allein in der Funktion des Urins als Abfallentsorger. Allerdings deuten die Ergebnisse darauf hin, dass es sich sehr wahrscheinlich bei den potentiellen Botenstoffen oder Signalen, die in der Urinzusammensetzung verborgen sind, um eine Mischung von Verbindungen handelt und nicht um eine einzelne Verbindung.

Die Anzahl der Proben erlaubte es, aufgrund ihrer relativ geringen Anzahl, nur zu untersuchen, ob Unterschiede in der Zusammensetzung des Urins nachweisbar sind und ob es Unterschiede zwischen den Arten oder den Geschlechtern gibt, nicht aber beides auf einmal. Jedoch konnte eindeutig gezeigt werden, dass sowohl männliche und weibliche Mausmakis, als auch die beiden Arten ihre eigenen charakteristischen Urinprofile besitzen. Olfaktorische Unterscheidung zwischen Arten und Geschlechtern und potentiell weiteren individuellen Eigenschaften könnten relevant sein für Mausmakis zum Beispiel bei der Partnerwahl, Verwandtenerkennung und dem Männchen-Männchen-Wettbewerb, aber auch für weiteres Sozialverhalten, wie das Wiederfinden der Mitglieder der eigenen Schlafgruppe am Morgen. Ob und wofür Mausmakis diese chemischen Signaturen nutzen, könnten zukünftige Verhaltensexperimente und physiologische Tests Aufschluss geben.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden flehmeninduzierende Urinextrakte von Hauskatzen mittels GC/MS untersucht. Diese bestanden hauptsächlich aus methyl- und ethylverzweigten und unverzweigten, gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. Besonders auffällig waren dabei die α - und δ -monoethylverzweigten und die α -, ω - und δ -, ω -diethylverzweigten, sowie β -monomethylverzweigten und β -, ω -dimethylverzweigten Fettsäuren. Zur Aufklärung der Struktur und für die Biotests mit den Katzen wurden sieben dieser Fettsäuren synthetisiert. Der Fokus lag vor allem auf den Fettsäuren, die in allen vier flehmeninduzierenden Fraktionen vorkamen. Die postulierten Strukturen von 3-Methylundecansäure (**44**), 3-Methyldodecansäure (**45**), (*E*)-2-Ethyl-oct-2-ensäure (**96**), (*E*)-2,4-Diethylhex-2-ensäure (**72**) und 4-Ethylhexadecansäure (**73**) wurden durch Synthese und den Vergleich der Retentionsindices mit denen der Naturstoffe bewiesen, konnten aber in den Biotests, durchgeführt von MIYAZAKI *et al.*, kein Flehmenverhalten bei den Katzen auslösen. Im Gegensatz dazu fiel der Biotest bei den synthetisierten Verbindungen 3-Methyldecansäure (**43**) und 3,9-Dimethyldecansäure (**87**) positiv aus. Aus diesem Grund wurden von beiden Verbindungen jeweils das *S*- und das *R*-Enantiomer synthetisiert. Anschließend konnten die absoluten Konfigurationen der beiden natürlich vorkommenden Verbindungen **85** und **94** mittels Gaschromatographie an chiraler Phase als *R*-Enantiomere aufgeklärt werden. Bei den Biotests gab es jedoch keinen Reaktionsunterschied, beide Enantiomere lösten bei 20-40% der Katzen das Flehmenverhalten aus. Das beste Ergebnis bei den Biotests erzielte eine Mischung, die der natürlichen Zusammensetzung im Urin nachempfunden war, aus 3-Methyldecansäure (**43**), 3,9-Dimethyldecansäure (**87**) und 3-Methyldodecansäure (**45**). Diese rief bei den Katzen das erste Mal ernsthaftes Interesse an synthetisierten, flüchtigen Verbindungen hervor. MIYAZAKI *et al.* fand zusätzlich heraus, dass die Zusammensetzung der Fettsäuren im Urin von Katze zu Katze variierte und diese auch über die Zeit stabil blieb. Außerdem können Katzen zwischen den unterschiedlichen Urinprofilen unterscheiden, was darauf hindeutet, dass es sich bei den unverzweigten und neu identifizierten verzweigten Fettsäuren um Schlüsselverbindungen zur individuellen Erkennung bei Katzen handelt.

Zukünftig sollten noch weitere Strukturen von verzweigten Fettsäuren aus den Urinextrakten aufgeklärt und untersucht werden, ob diese zum Auslösen des Flehmenverhaltens beitragen. Außerdem sollten weitere Mischungen aus verzweigten und unverzweigten Fettsäuren getestet werden, ob sie bei einer größeren Anzahl an Katzen das Flehmenverhalten hervorrufen können.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden 22 Urinextrakte zweier Mausmakiarten, *Microcebus murinus* und *Microcebus lehilahytsara*, mittels GC/MS analysiert. Als beste Methode zur Extraktion stellten sich Dichlormethanextrakte des Urins heraus. Mit dieser Methode wurden insgesamt 1321 verschiedene Verbindungen im Urin gefunden, wovon 477 (36%) Verbindungen identifiziert werden konnten. Die Strukturvielfalt der identifizierten Verbindungen ist beeindruckend, sie reicht von den Stoffklassen der Alkohole, Aldehyde, Amide, Ketone über (Fett-) Säuren, Ester, Terpene, Steroide und Heterozyklen wie Lactone, Indole oder Chinoline bis hin zu stickstoff- und schwefelhaltigen Verbindungen.

Bei dem Vergleich der flüchtigen Urinprofile der Geschlechter beider Arten zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der gefundenen Verbindungen im Urin. Die Männchen wiesen dabei eine unterdurchschnittliche Anzahl an Verbindungen auf, während die Weibchen eine überdurchschnittliche Anzahl an Verbindungen besaßen. Die Diskriminanzanalyse zeigte außerdem einen signifikanten Unterschied in der Zusammensetzung der Urinextrakte der Geschlechter. Fünf Verbindungen, Benzylacetat (**121**), Benzylpropionat (**122**) und drei unbekannte Verbindungen, waren charakteristisch für das Urinprofil der Männchen, wobei die unbekannte Verbindung **U1** auch vereinzelt in dem Urin der Weibchen vorkam. Die Weibchen hingegen wiesen 42 Verbindungen auf, die spezifisch für ihr Urinprofil waren. Davon konnten 23 Verbindungen identifiziert werden, diese gehörten verschiedensten Verbindungsklassen an unter anderem kurzkettigen Alkoholen, Fettsäuren und Estern. Die restlichen 19 Verbindungen waren unbekannte Verbindungen. Alle 42 wurden auch im Urin der Männchen gefunden, dennoch überwiegen sie deutlich bei den Weibchen. Diese erheblichen Unterschiede zwischen den Geschlechtern könnten physiologisch begründet sein, möglicherweise teilen die Weibchen aber auch mehr Informationen über die Verbindungen im Urin mit als die Männchen.

Auch die beiden Arten *Microcebus murinus* und *Microcebus lehilahytsara* zeigten bei der Diskriminanzanalyse einen signifikanten Unterschied in der Zusammensetzung ihrer flüchtigen Urinprofile. *M. murinus* wies 15 Verbindungen auf, die charakteristisch für das Urinprofil dieser Art waren, wobei fünf Verbindungen vereinzelt auch im Urin von *M. lehilahytsara* zu finden waren. Bei neun der fünfzehn Verbindungen handelte es sich um bekannte Verbindungen, die hauptsächlich zu der Stoffklasse der Ketone und aromatischen Amide gehörten. Für das charakteristische Urinprofil von *M. lehilahytsara* waren sieben Verbindungen kennzeichnend, die alle unbekannt waren. Zwei dieser Verbindungen waren spezifisch für *M. lehilahytsara*, die restlichen fünf Verbindungen wurden auch in geringer Anzahl im Urin von *M. murinus* nachgewiesen.

Es konnte in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass sowohl männliche und weibliche Mausmakis, als auch die beiden Arten ihre eigenen charakteristischen Urinprofile besitzen. Ob und wofür Mausmakis diese chemischen Signaturen nutzen, könnten zukünftige Verhaltensexperimente und physiologische Tests Aufschluss drüber geben. Zukünftig könnte außerdem untersucht werden, welchen Einfluss der Urin auf das Verhalten hat und ob es jahreszeitliche und/oder fruchtbarkeitsabhängige Veränderungen der Zusammensetzung des Urins gibt, zum Beispiel ob die Weibchen über den Urin ihren Fruchtbarkeitsstatus den Männchen mitteilen oder sie womöglich anlocken, wenn sie fruchtbar sind.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Informationen

6.1.1 Synthese

Die verwendeten Chemikalien wurden bei den Firmen Acros, Alfa Aesar, Fluka, Merck, TCI und Sigma Aldrich käuflich erworben und sofern nicht anders beschrieben, ohne weitere Aufreinigung verwendet. Alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und wenn nötig nach Standardmethoden absolutiert.^[143] Luft- und feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden in ausgeheizten Apparaturen unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

6.1.2 Dünnschicht- und Säulenchromatographie

Die chromatografische Aufreinigung von Rohprodukten wurde an Kieselgel 60M (40-63 μm Korngröße) der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Für die Dünnschichtchromatografie wurden mit Kieselgel beschichtete Fertigkieselgelfolien Polygram® SIL G/UV₂₅₄ ebenfalls von der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Detektion der Analyten erfolgte mit gängigen Anfärbereagenzien (Molybdätdiäthylphosphorsäure, Kaliumpermanganat oder Vanillin) und UV-Licht (254 nm).

6.1.3 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Aufnahme von NMR-Spektren erfolgte an folgenden Geräten der Firma Bruker: DRX-400 (^1H -NMR: 399.8 MHz, ^{13}C -NMR: 100.5 MHz), AV III-400 (^1H -NMR: 400.4 MHz, ^{13}C -NMR: 100.7 MHz) und AV II-500 (^1H -NMR: 500.3 MHz, ^{13}C -NMR: 125.8 MHz). Falls nicht anders angegeben, wurden die ^1H -NMR-Spektren und die ^{13}C -NMR-Spektren in Chloroform-*d* gegen Tetramethylsilan (TMS) als interner Standard ($\delta = 0.00$ ppm) gemessen. Die Spinmultiplizität der ^{13}C -Spektren wurde mit Hilfe der DEPT-Methode bei einem Pulswinkel von 135° bestimmt.

6.1.4 Gaschromatographische Trennungen an chiraler Phase (GC)

Die gaschromatographischen Trennungen der Enantiomere erfolgten an Geräten des Typs GC 7820 A und GC 7890 A (Agilent Technologies) mit Flammenionisationsdetektor, wobei Wasserstoff als Trägergas eingesetzt wurde. Bei der eingesetzten stationären Phase handelte es sich um Hydrodex-6-TBDMS 2,3-di-O-methyl-6-TBDMS- β -cyclodextrin der Firma Macherey&Nagel (25 m x 0.25 mm i.D.). Die Messbedingungen sind in den entsprechenden Kapiteln einzusehen.

6.1.5 Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung

Die Messungen der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analysen erfolgte an drei verschiedenen Geräten. Synthetische Proben wurden an einem Gaschromatograph HP 6890 in Verbindung mit einem Massenspektrometer HP 5973 Mass Selective Detector der Firma Hewlett-Packard mit Split/Splitless-Injektor (split 20:1) untersucht. Das Gerät war mit einer HP-5ms Fused-Silica Kapillarsäule (30 m x 0.25 mm i.D., 0.25 μ m Filmdicke; Agilent Technologies) bestückt und als Trägergas wurde Helium verwendet, bei einem konstanten Volumenstrom von 1.2 mL/min. Der Mass Selective Detector arbeitete mit einer Beschleunigungsspannung von 70 eV im Elektronenstoßionisationsmodus. Sofern nicht anders angegeben, wurde die Ofentemperatur fünf Minuten bei 50°C gehalten und anschließend mit 10°C/Min auf 320°C geheizt.

Für Naturextrakte wurde entweder ein Gaschromatograph des Typs 7890 A gekoppelt mit einem Massenspektrometer des Typs 5975 C Mass Selective Detector von Agilent Technologies mit Split/Splitless-Injektor (splitless) eingesetzt oder ein Gaschromatograph des Typs 7890 B gekoppelt mit einem Massenspektrometer des Typs 5977 A Mass Selective Detector von Agilent Technologies mit Split/Splitless-Injektor (splitless). Beide Geräte waren mit einer Fused-Silica-Kapillarsäule (HP-5ms, 30 m x 0.25 mm i.D., 0.25 μ m Filmdicke; Agilent Technologies) bestückt. Als Trägergas diente Helium mit einem Volumenstrom von 1.2 mL pro Minute. Die Beschleunigungsspannung betrug 70 eV. Sofern nicht anders angegeben, wurde die Ofentemperatur fünf Minuten bei 50°C gehalten und dann 5°C/Min auf 320°C geheizt. Retentionsindices wurden durch Injektion einer homologen Reihe der *n*-Alkane (C₈-C₃₂) ermittelt. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte durch den Vergleich der Massenspektren mit verschiedenen Bibliotheken (Wiley 7 und NIST 08/11).

6.1.6 Polarimetrie

Die Drehwerte optisch aktiver Substanzen wurden auf einem Propol Digital Automatic Polarimeter der Firma Dr. Kernchen in einer 1 cm Küvette bei einer Wellenlänge von 578 nm bestimmt und sind in $\text{deg}\cdot\text{cm}^3/\text{g}\cdot\text{dm}$ angegeben. Als Lösungsmittel diente Dichlormethan CHROMASOLV® von Sigma Aldrich.

6.1.7 Urinproben von Mausmakis

Urinproben wurden von neun (4 Weibchen, 5 Männchen) *Microcebus murinus* und von neun (3 Männchen, 6 Weibchen) *Microcebus lehilahytsara* genommen. Sie waren in der Kolonie des Instituts für Zoologie an der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover untergebracht. Die Proben wurden ad libitum erhalten, entweder während der wöchentlichen Routineuntersuchungen, wenn die Tiere spontan urinierten oder durch modifizierte Schlafboxen mit perforierten Metallboden, sodass der Urin direkt über einen Metalltunnel in den Probenflaschen gesammelt wurde. Die Probennahmemethoden wurden genehmigt durch die Bezirksregierung (LAVES) Nr. 33.12-42502-04-14/1454. Alle Proben wurden sofort in inertem KH-Flaschen G1 klar-BF-FM mit blauem Schraubdeckel von CS Chromatographie Service bei -20°C bis zur Extraktion eingefroren. Die Urinproben wurden zwischen dem 18. März und dem 22. April der Jahre 2013, 2014 und 2015 gesammelt, das heißt während des Reproduktionszeitraums der Kolonie. Alle bis auf ein Männchen (Guido) hatten am Tag der Probennahme voll entwickelte Hoden. Alle bis auf zwei Weibchen wurden während der Interöstrusphase beprobt, das heißt in der Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Östrusperioden. Von zwei Weibchen (Olympia und Irmi-2) wurden die Urinproben am ersten Tag des zweiten Östrus des Reproduktionszeitraums genommen. Vier Tiere (Napoleon, Nigel, Nimbus und Irmi) wurden doppelt beprobt.

6.1.8 Urinextrakte von Mausmakis

Für die Urinextrakte der Mausmakis wurden 0.25 – 1.2 mL Urin eines Individuums mit 300 μL Dichlormethan versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurden die Phasen getrennt und die organische Phase über NaCl getrocknet. Die Extrakte wurden mittels GC/MS analysiert.

6.1.9 Statistische Analyse

Anwesenheit oder Abwesenheit von allen Verbindungen wurde für jede Probe vermerkt. Vor der statistischen Analyse wurden alle Verbindungen entfernt, die entweder in allen Proben oder in nur einer Probe identifiziert wurden. Außerdem wurden nur Verbindungen mit einem Retentionsindex von unter 2000 in die statistische Analyse miteinbezogen. Durch diese Herangehensweise wurden 385 Verbindungen in der weiteren Analyse berücksichtigt. Diese Liste mit allen anwesenden und abwesenden Codes von allen Proben wurden einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) unterzogen mit dem Programm STATISTICA 12 (Statsoft, Inc.). Insgesamt wurden 21 Hauptkomponenten erhalten, die die Streuung im Datenset erklären. Die Eigenwerte lagen zwischen 6.56 und 60.68 und die einzelnen Komponenten erklärten zwischen 1.71% und 15.76% der Varianz, die im Datenset enthalten waren.

Die ersten 15 Hauptkomponenten (86.395 % der Varianz erklärend) für alle Proben wurden in zwei Diskriminanzanalysen (schrittweise vorangehend bis ein Wert von $p = 0.05$ erreicht wurde) eingesetzt. Eine DFA für die Unterscheidung zwischen den Geschlechtern und eine für die Unterscheidung zwischen den Arten. Alle Proben wurden mittels der berechneten Diskriminanzfunktion entsprechend dem Geschlecht (männlich, weiblich) oder der Art (*M. murinus*, *M. lehilahytsara*) eingeordnet. Der Faktor mit dem höchsten und signifikantesten Beitrag zu der jeweiligen Diskriminanzfunktion wurde gefiltert in Hinsicht auf Verbindungen mit den Faktorladungen >0.6 oder <-0.6 .

6.2 Derivatisierungen

6.2.1 Silylierung von Alkoholen und Säuren

10 μL der zu silylierenden Probe wurden in 50 μL Dichlormethan aufgenommen und mit 20 μL *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für eine Stunde auf 60°C erhitzt und anschließend im Stickstoffstrom eingeeengt.

6.2.2 Veresterung zu Methylestern mit Diazomethan

Zu einer Lösung aus 20 mg Diazald in Diethylether/Diethylenglycolether (1:1) wurden langsam 0.5 mL einer Lösung bestehend aus 10 g KOH in 100 mL Wasser/Methanol (1:1) hinzugegeben. Das entstehende Diazomethan wurde in gekühlten Diethylether geleitet, sodass eine gelbe Lösung entstand. Diese Lösung wurde nun langsam bis zur dauerhaften Gelbfärbung zu der zu methylierenden Probe getropft. Anschließend wurde die Probe bis zur Entfärbung offen stehen gelassen.^{[144],[145]}

6.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

6.3.1 Wittig Reaktion

(Methoxycarbonylmethylen)-triphenylphosphoran (1 Äq) und ein Aldehyd (1 Äq) wurden in Dichlormethan (2.5 mL/mmol) gelöst und für 24 Stunden unter Rückfluss erhitzt.^[67] Anschließend wurde die Lösung eingeeengt und so viel Diethylether hinzugegeben, bis Triphenylphosphinoxid ausfiel. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

6.3.2 Konjugierte Addition an α,β -ungesättigte Ester

Methylmagnesiumchlorid (3 M in THF, 1.2 Äq), DMAP (2.4 Äq), und $\text{CuBr} \cdot \text{Me}_2\text{S}$ (0.05 Äq) wurden in THF (2.4 mL/mmol) vorgelegt und auf -78°C abgekühlt. Anschließend wurde eine Mischung aus α,β -ungesättigten Ester (1 Äq) und Chlortrimethylsilan (2 Äq), gelöst in THF (0.8 mL/mmol), langsam zu dem Reaktionsgemisch hinzugegetropft.^[68] Das Gemisch wurde über Nacht gerührt, wobei es sich auf RT erwärmte. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Triethylamin (0.28 mL/mmol) in Hexan (4 mL/mmol) beendet. Anschließend wurde halbkonzentrierte Essigsäure hinzugefügt, bis sich der zuvor entstandene Niederschlag vollständig gelöst hatte. Die gebildeten zwei Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt.

6.3.3 Verseifung von Methylestern

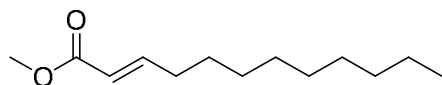
Ein Methylester (1 Äq) wurde in einem Gemisch aus THF/MeOH/Wasser (2:2:1) gelöst. LiOH (20 Äq) wurde hinzugegeben und das Gemisch für 24 Stunden unter Rückfluss erhitzt.^[69] Nach dem Abkühlen wurde das Gemisch mit Schwefelsäure (6 M) angesäuert und die organischen Lösungsmittel zum Großteil am Rotationsverdampfer entfernt. Die verbliebene wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt.

6.3.4 Enantioselektive konjugierte Addition an α,β -ungesättigte Ester mit Tol-BINAP

Zur Aktivierung des Katalysators wurden Kupferiodid (5 mol%) und (*R*)- bzw. (*S*)- 2,2'-Bis(di-*p*-tolylphosphino)-1,1'-binaphthyl (Tol-BINAP) (**82**, **83**) (7.5 mol%) in trockenem *tert*-Butylmethylether (4 mL/mmol) über Nacht bei RT gerührt, dabei färbt sich die Suspension gelb. Am nächsten Tag wurde die Suspension auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und Methylmagnesiumbromid (3M in Et₂O, 4.5 Äq) über einen Zeitraum von fünf Minuten hinzutropft. Ein ungesättigter Ester (1 Äq) wurde in trockenem *tert*-Butylmethylether (1.2 mL/mmol) gelöst und langsam zu der Suspension hinzutropft.^[70] Die Reaktionsmischung wurde für 2 Stunden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt, anschließend durch Zugabe von MeOH (4 mL/mmol) und gesättigter NH₄Cl-Lösung (18.8 mL/mmol) gequencht und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

6.4 Synthese

6.4.1 2-Dodecensäuremethylester (**79**)



Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.1** aus (Methoxycarbonylmethylen)-triphenylphosphoran (6.0 g, 17.94 mmol) und Decanal (**76**) (3.54 mL,

18.84 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL). Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte den gewünschten Ester **79** als klare Flüssigkeit.

Ausbeute: 2.12 g (10.0 mmol), 56%.

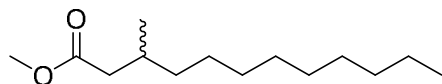
DC: R_f: 0.25 (Pentan/Et₂O 80:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.88 (t, *J* = 6.9, 3 H, CH₃), 1.26 – 1.32 (m, 12 H, 6 x CH₂), 1.41 – 1.47 (m, 2 H, CH₂), 2.19 (qd, *J* = 7.2, 1.5 Hz, 2 H, CH₂), 3.72 (s, 3 H, CH₃), 5.82 (dt, *J* = 15.7, 1.6 Hz, 1 H, CH), 6.97 (dt, *J* = 15.7, 6.9 Hz, 1 H, CH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.1 (s, CH₃), 22.6 (s, CH₂), 27.8 (s, CH₂), 29.3 (s, CH₂), 29.3 (s, CH₂), 29.4 (s, CH₂), 29.5 (s, CH₂), 32.2 (s, CH₂), 33.1 (s, CH₂), 51.3 (s, CH₃), 120.8 (s, CH), 149.8 (s, CH), 166.5 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%): 212 (1) [M⁺], 181 (32), 180 (14), 141 (12), 138 (31), 137 (13), 127 (14), 123 (15), 113 (42), 110 (16), 109 (16), 101 (22), 100 (26), 98 (23), 97 (31), 96 (45), 95 (29), 87 (100), 85 (17), 84 (34), 83 (31), 82 (25), 81 (60), 79 (13), 74 (37), 71 (24), 69 (42), 68 (44), 67 (37), 59 (33), 57 (29), 55 (80), 53 (32), 43 (72), 41 (94).

6.4.2 3-Methyldodecansäuremethylester (**30**)



Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.2**. Dabei wurde 2-Dodecensäuremethylester (**79**) (0.69 g, 3.27 mmol) mit Methylmagnesiumchlorid (3 M in THF, 1.35 mL, 3.92 mmol) alkyliert.

Ausbeute: 0.52 g (2.29 mmol), 70%.

DC: R_f: 0.29 (Pentan/Et₂O 80:1).

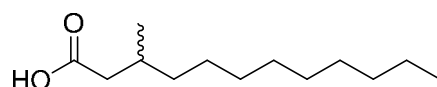
GC: *I* = 1563 (HP-5ms).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3 H, CH₃), 0.92 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.18 – 1.32 (m, 16 H, 8 x CH₂), 1.91 – 1.98 (m, 1 H, CH), 2.11 (dd, *J* = 14.7, 7.9 Hz, 1H, CH₂), 2.31 (dd, *J* = 14.7, 6.1 Hz, 1H, CH₂), 3.66 (s, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.1 (s, CH₃), 19.7 (s, CH₃), 22.7 (s, CH₂), 26.9 (s, CH₂), 29.4 (s, CH₂), 29.6 (s, CH₂), 29.6 (s, CH₂), 29.7 (s, CH₂), 30.4 (s, CH), 31.9 (s, CH₂), 37.0 (s, CH₂), 41.7 (s, CH₂), 51.3 (s, CH₃), 173.9 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%): 228 (10) [M⁺], 213 (8), 197 (21), 185 (12), 171 (10), 157 (10), 102 (9), 101 (93), 87 (11), 75 (29), 74 (100), 69 (20), 59 (14), 55 (20), 43 (23), 41 (22).

6.4.3 3-Methyldodecansäure (45)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.3** wurde 3-Methyldodecansäuremethylester (**30**) (0.65 g, 2.86 mmol) mit LiOH (1.37 g, 57.2 mmol) in einem THF/MeOH/H₂O Gemisch (2:2:1, 55 mL) verseift. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte die gewünschte Säure **45** als klare Flüssigkeit.

Ausbeute: 0.56 g (2.6 mmol), 91%.

DC: R_f 0.41 (Pentan/Ethylacetat 30:1).

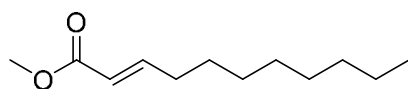
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3 H, CH₃), 0.96 (d, *J* = 6.5 Hz, 3 H, CH₃), 1.21 – 1.32 (m, 16 H, 8 x CH₂), 1.94 – 1.97 (m, 1 H, CH), 2.14 (dd, *J* = 14.9 Hz, 8.2, 1H, CH₂), 2.35 (dd, *J* = 14.9, 5.8 Hz, 1H, CH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.1 (s, CH₃), 19.7 (s, CH₃), 22.7 (s, CH₂), 26.9 (s, CH₂), 29.3 (s, CH₂), 29.6 (s, CH₂), 29.6 (s, CH₂), 29.7 (s, CH₂), 30.2 (s, CH), 31.9 (s, CH₂), 36.7 (s, CH₂), 41.6 (s, CH₂), 179.7 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) als MSTFA-Derivat: 286 (6) [M⁺], 273 (9), 272 (29), 271 (100), 159 (34), 145 (12), 143 (29), 133 (8), 132 (34), 118 (9), 117 (70), 75 (32), 73 (40), 69 (10), 43 (9).

HRMS (ESI +): *m/z*: [M+Na]⁺ gef.: 237.18256, ber.: 237.18305.

6.4.4 2-Undecensäuremethylester (78)



Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.1** aus (Methoxycarbonylmethylen)-triphenylphosphoran (6.0 g, 17.94 mmol) und Nonanal (**75**) (3.03 mL, 17.94 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL). Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte den gewünschten Ester **78** als klare Flüssigkeit.

Ausbeute: 2.50 g (12.63 mmol), 70%.

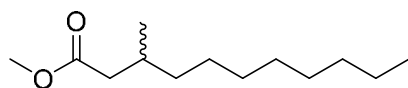
DC: R_f 0.32 (Pentan/Et₂O 50:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3 H, CH₃), 1.27 – 1.32 (m, 10 H, 5 x CH₂), 1.45 (q, *J* = 7.3 Hz, 2 H, CH₂), 2.19 (qd, *J* = 7.2, 1.6 Hz, 2 H, CH₂), 3.73 (s, 3 H, CH₃), 5.82 (dt, *J* = 15.7, 1.6 Hz, 1 H, CH), 6.97 (dt, *J* = 15.7, 6.9 Hz, 1 H, CH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.1 (s, CH₃), 22.6 (s, CH₂), 28.0 (s, CH₂), 29.1 (s, CH₂), 29.2 (s, CH₂), 29.3 (s, CH₂), 31.8 (s, CH₂), 32.2 (s, CH₂), 51.3 (s, CH₃), 120.8 (s, CH), 149.8 (s, CH), 167.2 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%): 198 (1) [M⁺], 167 (46), 166 (18), 141 (10), 137 (14), 127 (12), 124 (39), 123 (18), 114 (11), 113 (45), 110 (11), 101 (21), 100 (25), 98 (19), 97 (16), 96 (31), 95 (21), 87 (100), 85 (12), 84 (26), 83 (23), 82 (23), 81 (42), 74 (28), 71 (11), 70 (11), 69 (29), 68 (26), 67 (19), 59 (18), 57 (18), 55 (46), 53 (15), 43 (24), 41 (40).

6.4.5 3-Methylundecensäuremethylester (29)



Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.2**. Dabei wurde 2-Undecensäuremethylester (**78**) (1.30 g, 6.56 mmol) mit Methylmagnesiumchlorid (3 M in THF, 2.63 mL, 7.87 mmol) alkyliert.

Ausbeute: 0.59 g (2.77 mmol), 42%.

DC: R_f 0.31 (Pentan/Et₂O 60:1).

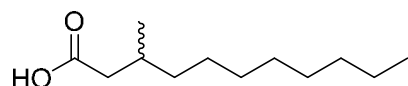
GC: $t = 1463$ (HP-5ms).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3 H, CH_3), 0.92 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.18 – 1.32 (m, 14 H, 7 x CH_2), 1.91 – 1.98 (m, 1 H, CH), 2.10 (dd, $J = 14.7, 8.2$ Hz, 1H, CH_2), 2.31 (dd, $J = 14.6, 6.0$ Hz, 1H, CH_2). 3.66 (s, 3 H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.1 (s, CH_3), 19.7 (s, CH_3), 22.7 (s, CH_2), 26.9 (s, CH_2), 29.3 (s, CH_2), 29.6 (s, CH_2), 29.7 (s, CH_2), 30.3 (s, CH), 31.9 (s, CH_2), 36.7 (s, CH_2), 41.7 (s, CH_2), 51.3 (s, CH_3), 173.8 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%): 214 (8) [M^+], 199 (7), 183 (23), 171 (11), 157 (14), 140 (7), 102 (8), 101 (93), 87 (10), 83 (7), 75 (22), 74 (100), 73 (7), 69 (15), 59 (12), 57 (9), 55 (16), 43 (18), 41 (17).

6.4.6 3-Methylundecansäure (44)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.3** wurde 3-Methylundecansäuremethylester (**29**) (0.59 g, 2.75 mmol) mit LiOH (1.32 g, 55.05 mmol) in einem THF/MeOH/ H_2O Gemisch (2:2:1, 53 mL) verseift. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte die gewünschte Säure **44** als klare Flüssigkeit.

Ausbeute: 0.23 g (1.13 mmol), 41%.

DC: R_f 0.45 (Pentan/Ethylacetat 20:1).

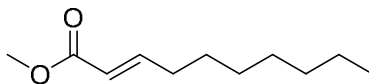
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3 H, CH_3), 0.96 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H, CH_3), 1.21 – 1.33 (m, 14 H, 7 x CH_2), 1.92 – 1.98 (m, 1 H, CH), 2.14 (dd, $J = 14.9, 8.2$ Hz, 1H, CH_2), 2.35 (dd, $J = 14.9, 5.8$ Hz, 1H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.1 (s, CH_3), 19.7 (s, CH_3), 22.7 (s, CH_2), 26.9 (s, CH_2), 29.3 (s, CH_2), 29.6 (s, CH_2), 29.7 (s, CH_2), 30.2 (s, CH), 31.9 (s, CH_2), 36.7 (s, CH_2), 41.6 (s, CH_2), 179.8 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) als MSTFA-Derivat: 272 (4) [M^+], 259 (8), 257 (99), 159 (41), 145 (18), 143 (41), 133 (10), 132 (46), 129 (8), 118 (14), 117 (100), 116 (10), 75 (61), 74 (9), 73 (68), 69 (17), 57 (7), 55 (13), 43 (17), 41 (18).

HRMS (ESI +): m/z : $[M+Na]^+$ gef.: 223.16698, ber.: 223.16740.

6.4.7 2-Decensäuremethylester (77)



Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.1** aus (Methoxycarbonylmethylen)-triphenylphosphoran (6.0 g, 17.94 mmol) und Octanal (**74**) (2.94 mL, 18.84 mmol) in CH_2Cl_2 (40 mL). Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte den gewünschten Ester **77** als klare Flüssigkeit.

Ausbeute: 2.39 g (12.97 mmol), 72%.

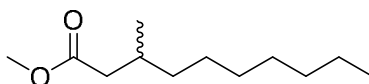
DC: R_f : 0.31 (Pentan/ Et_2O 60:1).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3 H, CH_3), 1.27 – 1.32 (m, 8 H, 4 x CH_2), 1.41 – 1.49 (m, 2 H, CH_2), 2.20 (qd, J = 7.2, 1.6 Hz, 2 H, CH_2), 3.73 (s, 3 H, CH_3), 5.82 (dt, J = 15.6, 1.6 Hz, 1 H, CH), 6.97 (dt, J = 15.7, 6.9 Hz, 1 H, CH).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 14.1 (s, CH_3), 22.6 (s, CH_2), 28.0 (s, CH_2), 29.0 (s, CH_2), 29.1 (s, CH_2), 31.7 (s, CH_2), 32.2 (s, CH_2), 51.4 (s, CH_3), 120.8 (s, CH), 149.8 (s, CH), 167.2 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%): $[M^+]$ fehlt, 153 (31), 152 (22), 123 (17), 113 (36), 111 (11), 110 (32), 101 (17), 100 (20), 97 (12), 96 (26), 95 (19), 87 (92), 85 (14), 84 (30), 83 (15), 82 (19), 81 (53), 79 (13), 74 (31), 71 (14), 69 (44), 68 (46), 67 (31), 59 (33), 56 (23), 55 (81), 54 (20), 53 (38), 43 (61), 42 (19), 41 (100), 40 (17), 39 (60).

6.4.8 3-Methyldecensäuremethylester (80)



Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.2**. Dabei wurde 2-Decensäuremethylester (**77**) (2.39 g, 12.97 mmol) mit Methylmagnesiumchlorid (3 M in THF, 5.17 mL, 15.56 mmol) alkyliert.

Ausbeute: 1.6 g (8.0 mmol), 62%.

DC: R_f 0.31 (Pentan/Et₂O 60:1).

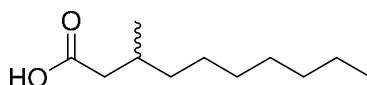
GC: $I = 1363$ (HP-5ms).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3 H, CH₃), 0.93 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H, CH₃), 1.16 – 1.32 (m, 12 H, 6 x CH₂), 1.90 – 1.98 (m, 1 H, CH), 2.11 (dd, $J = 14.7, 8.1$ Hz, 1H, CH₂), 2.30 (dd, $J = 14.7, 6.1$ Hz, 1H, CH₂). 3.66 (s, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.1 (s, CH₃), 19.7 (s, CH₃), 22.7 (s, CH₂), 26.9 (s, CH₂), 29.3 (s, CH₂), 29.7 (s, CH₂), 30.4 (s, CH), 31.9 (s, CH₂), 36.7 (s, CH₂), 41.7 (s, CH₂), 51.3 (s, CH₃), 173.8 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%): 200 (4) [M⁺], 185 (5), 169 (17), 157 (11), 143 (7), 102 (7), 101 (73), 87 (11), 83 (7), 75 (24), 74 (100), 73 (9), 69 (21), 59 (17), 57 (11), 55 (21), 43 (28), 41 (28).

6.4.9 3-Methyldecansäure (43)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.3** wurde 3-Methyldecansäuremethylester (**80**) (0.30 g, 1.50 mmol) mit LiOH (0.72 g, 30.0 mmol) in einem THF/MeOH/H₂O Gemisch (2:2:1, 29 mL) verseift. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte die gewünschte Säure **43** als klare Flüssigkeit.

Ausbeute: 0.24 g (1.31 mmol), 87%.

DC: R_f 0.27 (Pentan/Ethylacetat 30:1).

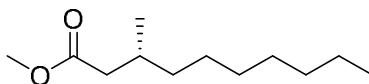
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3 H, CH₃), 0.96 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H, CH₃), 1.21 – 1.34 (m, 12 H, 6 x CH₂), 1.94 – 1.99 (m, 1 H, CH), 2.14 (dd, $J = 15.0, 8.2$ Hz, 1H, CH₂), 2.35 (dd, $J = 15.0, 5.9$ Hz, 1H, CH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.1 (s, CH₃), 19.7 (s, CH₃), 22.7 (s, CH₂), 26.9 (s, CH₂), 29.3 (s, CH₂), 29.7 (s, CH₂), 30.2 (s, CH), 31.9 (s, CH₂), 36.7 (s, CH₂), 41.6 (s, CH₂), 179.7 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%): als MSTFA-Derivat: 258 (3) [M^+], 244 (22), 243 (92), 159 (33), 145 (17), 143 (36), 133 (8), 132 (40), 129 (9), 118 (12), 117 (100), 116 (8), 75 (66), 74 (10), 73 (72), 69 (17), 55 (12), 45 (8), 43 (17), 41 (19).

HRMS (ESI +): m/z : [$M+Na$] $^+$ gef.: 209.15130, ber.: 209.15175.

6.4.10 (*R*)-3-Methyldecansäuremethylester (28)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.4** wurde der ungesättigte Ester **77** (0.98 g, 5.32 mmol) mit Hilfe des (*R*)-Tol-BINAP-Katalysators (**82**) (0.25 g, 0.37 mmol) und Methylmagnesiumbromid (7.74 mL, 23.94 mmol) enantioselektiv alkyliert.

Ausbeute: 0.46 g (2.3 mmol), 43%, 97% ee (GC), $[\alpha]_D^{24.7} = +3.3$ ($c = 1.23$ in CH_2Cl_2), Lit.: $[\alpha]_D^{20.0} = +4.8$ ($c = 2.02$ in CH_2Cl_2).^[146]

DC: R_f : 0.31 (Pentan/ Et_2O 60:1).

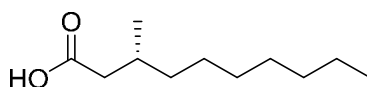
GC: $I = 1363$ (HP-5ms).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3 H, CH_3), 0.92 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H, CH_3), 1.16 – 1.32 (m, 12 H, 6 x CH_2), 1.90 – 1.98 (m, 1 H, CH), 2.11 (dd, $J = 14.7, 8.2$ Hz, 1H, CH_2), 2.31 (dd, $J = 14.8, 6.0$ Hz, 1H, CH_2). 3.67 (s, 3 H, CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 14.1 (s, CH_3), 19.8 (s, CH_3), 22.7 (s, CH_2), 26.9 (s, CH_2), 29.3 (s, CH_2), 29.7 (s, CH_2), 30.4 (s, CH), 31.9 (s, CH_2), 36.7 (s, CH_2), 41.7 (s, CH_2), 51.3 (s, CH_3), 173.9 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%): 200 (3) [M^+], 185 (3), 169 (13), 157 (8), 143 (5), 102 (5), 101 (66), 87 (10), 83 (6), 75 (21), 74 (100), 73 (8), 69 (20), 59 (18), 57 (11), 55 (21), 43 (30), 41 (32).

6.4.11 (*R*)-Methyldecansäure (**85**)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.3** wurde der Ester **28** (0.28 g, 1.40 mmol) mit LiOH (0.67 g, 28.0 mmol) in einem THF/MeOH/H₂O Gemisch (2:2:1, 27 mL) verseift. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte die gewünschte Säure **85** als klare Flüssigkeit.

Ausbeute: 0.23 g (1.24 mmol), 89%, $[\alpha]_D^{24.7} = +8.6$ ($c = 1.63$ in CH₂Cl₂).

DC: R_f 0.12 (Pentan/Ethylacetat 30:1).

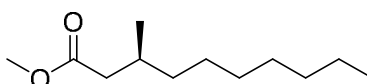
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3 H, CH₃), 0.96 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, CH₃), 1.19 – 1.33 (m, 12 H, 6 x CH₂), 1.95 (dq, $J = 12.7, 6.6$ Hz, 1 H, CH), 2.14 (dd, $J = 15.0, 8.2$ Hz, 1H, CH₂), 2.35 (dd, $J = 15.0, 5.8$ Hz, 1H, CH₂).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.1 (s, CH₃), 19.7 (s, CH₃), 22.7 (s, CH₂), 26.9 (s, CH₂), 29.3 (s, CH₂), 29.7 (s, CH₂), 30.2 (s, CH), 31.9 (s, CH₂), 36.7 (s, CH₂), 41.6 (s, CH₂), 179.9 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) als MSTFA-Derivat: 258 (3) [M⁺], 245 (7), 244 (25), 243 (100), 159 (35), 145 (18), 143 (35), 133 (8), 132 (39), 129 (8), 118 (12), 117 (97), 116 (7), 75 (55), 74 (8), 73 (61), 69 (14), 55 (9), 43 (12), 41 (13).

HRMS (ESI +): m/z : [M+Na]⁺ gef.: 209.15129, ber.: 209.15175.

6.4.12 (*S*)-3-Methyldecansäuremethylester (**84**)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.4** wurde der ungesättigte Ester **77** (1.15 g, 6.26 mmol) mit Hilfe des (*S*)-Tol-BINAP-Katalysators (**83**) (0.30 g, 0.44 mmol) und Methylmagnesiumbromid (8.76 mL, 28.17 mmol) enantioselektiv alkyliert.

Ausbeute: 0.40 mg (2.0 mmol), 38%, 97% ee (GC), $[\alpha]_D^{24.7} = -3.4$ ($c = 1.23$ in CH₂Cl₂), Lit.: $[\alpha]_D^{20.0} = -4.2$ ($c = 2.03$ in CH₂Cl₂).^[146]

DC: R_f 0.31 (Pentan/Et₂O 60:1).

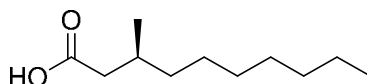
GC: $t = 1363$ (HP-5ms).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 0.92 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.16 – 1.32 (m, 12 H, 6 x CH_2), 1.90 – 1.98 (m, 1 H, CH), 2.11 (dd, $J = 14.7, 8.2$ Hz, 1H, CH_2), 2.31 (dd, $J = 14.8, 6.0$ Hz, 1H, CH_2). 3.67 (s, 3 H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.1 (s, CH_3), 19.7 (s, CH_3), 22.7 (s, CH_2), 26.9 (s, CH_2), 29.3 (s, CH_2), 29.7 (s, CH_2), 30.4 (s, CH), 31.9 (s, CH_2), 36.7 (s, CH_2), 41.7 (s, CH_2), 51.3 (s, CH_3), 173.9 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%): 200 (3) [M^+], 185 (4), 169 (13), 157 (9), 143 (6), 102 (6), 101 (67), 87 (11), 83 (7), 75 (24), 74 (100), 73 (9), 69 (21), 59 (19), 57 (12), 55 (24), 43 (33), 42 (11), 41 (34).

6.4.13 (S)-3-Methyldecansäure (86)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.3** wurde der Ester **81** (0.32 g, 1.61 mmol) mit LiOH (0.77 g, 32.25 mmol) in einem THF/MeOH/ H_2O Gemisch (2:2:1, 31 mL) verseift. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte die gewünschte Säure **86** als klare Flüssigkeit.

Ausbeute: 0.27 g (1.47 mmol), 91%, $[\alpha]_D^{24.7} = -6.3$ ($c = 1.58$ in CH_2Cl_2).

DC: R_f 0.12 (Pentan/Ethylacetat 30:1).

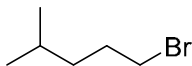
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H, CH_3), 0.96 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, CH_3), 1.19 – 1.33 (m, 12 H, 6 x CH_2), 1.92 – 1.98 (m, 1 H, CH), 2.14 (dd, $J = 15.0, 8.2$ Hz, 1H, CH_2), 2.35 (dd, $J = 15.0, 5.8$ Hz, 1H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.1 (s, CH_3), 19.7 (s, CH_3), 22.7 (s, CH_2), 26.9 (s, CH_2), 29.3 (s, CH_2), 29.7 (s, CH_2), 30.2 (s, CH), 31.9 (s, CH_2), 36.7 (s, CH_2), 41.6 (s, CH_2), 179.8 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) als MSTFA-Derivat: 258 (3) [M^+], 245 (7), 244 (23), 243 (100), 159 (33), 145 (17), 143 (35), 133 (8), 132 (39), 129 (8), 118 (12), 117 (99), 116 (8), 75 (63), 74 (9), 73 (67), 69 (16), 55 (11), 43 (15), 41 (16).

HRMS (ESI +): m/z : $[M+Na]^+$ gef.: 209.15127, ber.: 209.15175.

6.4.14 1-Brom-4-methylpentan (**89**)



Brom (2.1 mL, 79.8 mmol, 1.33 Äq) wurde tropfenweise zu einer Lösung aus Triphenylphosphin (21.0 g, 79.8 mmol, 1.33 Äq) in trockenem CH_2Cl_2 (120 mL) bei $0^\circ C$ hinzugegeben bis die gelbe Farbe bestehen blieb.^[75] Anschließend wurde 4-Methylpentanol (**88**) (7.5 mL, 60.0 mmol, 1.0 Äq) in trockenem CH_2Cl_2 gelöst und der Suspension beigelegt.^[147] Diese wurde dann für 2 Stunden bei $0^\circ C$ gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Diethylether (600 mL) verdünnt und mit gesättigter Natriumthiosulfat-Lösung (200 mL) gewaschen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase dreimal mit Et_2O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte das gewünschte Bromid **89** als klare Flüssigkeit.

Ausbeute: 8.38 g (50.78 mmol), 85%.

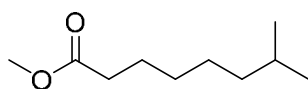
DC: R_f 0.91 (Pentan/ Et_2O 5:1).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 0.90 (d, J = 6.8 Hz, 6 H, 2 x CH_3), 1.28 – 1.34 (m, 2 H, CH_2), 1.54 – 1.61 (m, 1 H, CH), 1.82 – 1.90 (m, 2 H, CH_2), 3.40 (t, J = 6.9 Hz, 2 H, CH_2).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 22.5 (s, 2 x CH_3), 27.5 (s, CH), 30.9 (s, CH_2), 34.3 (s, CH_2), 37.4 (s, CH_2).

MS (EI, 70 eV): m/z (%): 166 (6), 164 (6) $[M^+]$, 151 (6), 149 (7), 109 (5), 107 (5), 85 (100), 69 (54), 57 (13), 56 (21), 55 (11), 53 (6), 43 (99), 42 (47), 41 (86), 40 (7), 39 (36).

6.4.15 7-Methyloctansäuremethylester (90)



Magnesiumspäne (1.02 g, 42.42 mmol, 1 Äq) wurden mit etwas Iod erhitzt und 10 Minuten gerührt. Danach wurden die Späne mit wenig trockenem THF überschichtet und einige Tropfen von dem Alkylbromid **89** hinzugegeben bis die Reaktion begann. Das restliche Alkylbromid **89** (7.0 g, 42.42 mmol, 1.0 Äq) wurde in trockenem THF (43 mL) gelöst und langsam hinzugegeben.^[68] Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch auf -78°C abgekühlt und DMAP (10.36 g, 84.84 mmol, 2.0 Äq) und $\text{CuBr}\cdot\text{Me}_2\text{S}$ (0.87 g, 4.24 mmol, 0.1 Äq) hinzugegeben. Anschließend wurde eine Lösung aus Methylacrylat (3.52 mL, 42.42 mmol, 1.0 Äq) und Trimethylsilylchlorid (7.98 mL, 84.84 mmol, 2.0 Äq) in trockenem THF (43 mL) tropfenweise über einen Zeitraum von 2 Stunden hinzugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht gerührt, wobei es sich auf RT erwärmte. Die Reaktion wurde durch Hinzugeben von 2 M HCl beendet. Die entstandenen Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte den gewünschte Ester **90** als klare Flüssigkeit.

Ausbeute: 3.39 g (19.69 mmol), 46%.

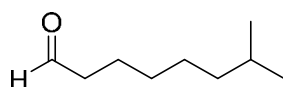
DC: R_f 0.6 (Pentan/ Et_2O 10:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.86 (d, J = 6.6 Hz, 6 H, 2 x CH_3), 1.14 – 1.19 (m, 2 H, CH_2), 1.29 (ddd, J = 7.5, 4.4, 3.3 Hz, 4 H, 2 x CH_2), 1.52 (dt, J = 13.3, 6.6 Hz, 1 H, CH), 1.60 – 1.64 (m, 2 H, CH_2), 2.30 (t, J = 7.6 Hz, 2 H, CH_2), 3.67 (s, 3 H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 22.6 (s, 2 x CH_3), 25.0 (s, CH_2), 27.0 (s, CH_2), 27.9 (s, CH), 29.4 (s, CH_2), 34.1 (s, CH_2), 38.8 (s, CH_2), 51.4 (s, CH_3), 174.3 (s, C_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%): 172 (4) [M^+], 157 (11), 141 (11), 129 (36), 125 (8), 123 (13), 101 (14), 97 (22), 88 (10), 87 (87), 83 (12), 81 (8), 75 (11), 74 (100), 69 (24), 59 (22), 57 (15), 55 (43), 43 (39), 42 (15), 41 (40), 39 (15).

6.4.16 7-Methyloctanal (**91**)

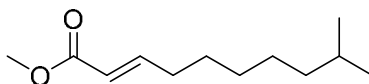


Der Ester **90** (2.75 g, 16.0 mmol, 1.0 Äq) wurde in trockenem CH₂Cl₂ (180 mL) gelöst und auf –78°C abgekühlt. DIBAL-H (1 M in Cyclohexan, 16.0 mL, 16.0 mmol, 1 Äq) wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten hinzugegeben.^[76] Das Reaktionsgemisch wurde für weitere 30 Minuten bei –78°C gerührt und anschließend mit gesättigter Natriumtartrat-Lösung beendet. Die entstandenen zwei Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 2.02 g (14.24 mmol), 89% (GC).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%): [M⁺] fehlt, 124 (7), 109 (36), 96 (21), 95 (15), 83 (15), 82 (28), 81 (38), 71 (13), 70 (20), 69 (30), 68 (23), 67 (33), 57 (100), 56 (57), 55 (57), 44 (26), 43 (68), 42 (21), 41 (80), 39 (33).

6.4.17 9-Methyl-2-decensäuremethylester (**92**)



Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.1** aus (Methoxycarbonylmethylen)-triphenylphosphoran (4.76 g, 14.24 mmol) und den 7-Methyloctanal (**91**) (2.02 g, 14.24 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL). Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte den gewünschten Ester **92** als klare Flüssigkeit.

Ausbeute: 2.58 g (13.01 mmol), 91%.

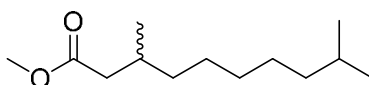
DC: R_f 0.31 (*E*) und 0.46 (*Z*) (Pentan/Et₂O 30:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.86 (d, *J* = 6.6 Hz, 6 H, 2 x CH₃), 1.14 – 1.19 (m, 4 H, 2 x CH₂), 1.26 – 1.31 (m, 2 H, CH₂), 1.42 – 1.58 (m, 3 H, 1 x CH₂, 1 x CH), 2.20 (qd, *J* = 7.2, 1.5 Hz, 2 H, CH₂), 3.73 (s, 3 H, CH₃), 5.82 (dt, *J* = 15.7, 1.5 Hz, 1 H, CH), 6.97 (dt, *J* = 15.7, 6.9 Hz, 1 H, CH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 22.6 (s, 2 x CH₃), 27.1 (s, CH₂), 27.9 (s, CH), 28.0 (s, CH₂), 29.4 (s, CH₂), 32.2 (s, CH₂), 38.9 (s, CH₂), 51.4 (s, CH₃), 120.8 (s, CH), 149.8 (s, CH), 167.2 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%): [M⁺] fehlt, 167 (28), 166 (13), 151 (17), 143 (21), 124 (19), 123 (39), 113 (48), 111 (32), 110 (20), 109 (15), 101 (20), 100 (21), 97 (15), 96 (22), 95 (32), 87 (100), 84 (14), 83 (42), 82 (32), 81 (63), 74 (27), 71 (14), 70 (18), 69 (64), 68 (36), 67 (31), 59 (28), 57 (40), 56 (38), 55 (74), 53 (27), 43 (69), 41 (82), 39 (33).

6.4.18 3,9-Dimethyldecansäuremethylester (81)



Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.2**. Dabei wurde der ungesättigte Ester **92** (0.30 g, 1.50 mmol) mit Methylmagnesiumchlorid (3 M in THF, 0.58 mL, 1.80 mmol) alkyliert.

Ausbeute: 0.26 g (1.21 mmol), 81%.

DC: *R_f*: 0.36 (Pentan/Et₂O 30:1).

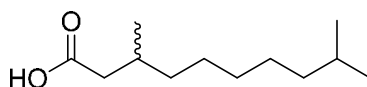
GC: *R_I* = 1426 (HP-5ms).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.86 (d, *J* = 6.5 Hz, 6 H, 2 x CH₃), 0.93 (d, *J* = 6.5 Hz, 3 H, CH₃), 1.12 – 1.19 (m, 2 H, CH₂), 1.22 – 1.32 (m, 8 H, 4 x CH₂), 1.48 – 1.56 (m, 1 H, CH), 1.90 – 1.98 (m, 1 H, CH), 2.11 (dd, *J* = 14.7, 8.1 Hz, 1 H, CH₂), 2.31 (dd, *J* = 14.6, 6.0 Hz, 1 H, CH₂), 3.67 (s, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 19.7 (s, CH₃), 22.6 (s, 2 x CH₃), 26.9 (s, CH₂), 27.4 (s, CH₂), 28.0 (s, CH), 30.0 (s, CH₂), 30.4 (s, CH), 36.7 (s, CH₂), 39.0 (s, CH₂), 41.7 (s, CH₂), 51.3 (s, CH₃), 173.9 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%): 214 (4) [M⁺], 199 (4), 183 (8), 171 (6), 157 (10), 102 (7), 101 (88), 97 (6), 87 (8), 83 (9), 75 (22), 74 (100), 73 (7), 71 (6), 69 (22), 59 (14), 57 (12), 55 (22), 43 (31), 42 (8), 41 (27).

6.4.19 3,9-Dimethyldecansäure (87)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.3** wurde der Ester **81** (0.26 g, 1.21 mmol) mit LiOH (0.58 g, 24.26 mmol) in einem THF/MeOH/H₂O Gemisch (2:2:1, 23 mL) verseift. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte die gewünschte Säure **87** als klare Flüssigkeit.

Ausbeute: 0.13 g (0.67 mmol), 56%.

DC: *R_f*: 0.14 (Pentan/Ethylacetat 20:1).

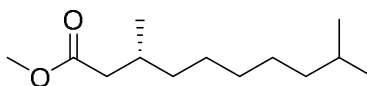
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.86 (d, *J* = 6.6 Hz, 6 H, 2 x CH₃), 0.97 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H, CH₃), 1.12 – 1.19 (m, 2 H, CH₂), 1.22 – 1.32 (m, 8 H, 4 x CH₂), 1.51 (dquin, *J* = 13.2, 6.7 Hz, 1 H, CH), 1.90 – 1.98 (m, 1 H, CH), 2.11 (dd, *J* = 14.9, 8.1 Hz, 1 H, CH₂), 2.35 (dd, *J* = 14.9, 5.8 Hz, 1 H, CH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 19.7 (s, CH₃), 22.6 (s, 2 x CH₃), 26.9 (s, CH₂), 27.4 (s, CH₂), 28.0 (s, CH), 30.0 (s, CH₂), 30.2 (s, CH), 36.7 (s, CH₂), 39.0 (s, CH₂), 41.6 (s, CH₂), 173.9 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) als MSTFA-Derivat: 272 (3) [M⁺], 259 (6), 258 (22), 257 (82), 160 (7), 159 (41), 145 (17), 143 (38), 133 (11), 132 (47), 129 (7), 118 (14), 117 (100), 116 (10), 75 (58), 74 (10), 73 (69), 69 (20), 57 (7), 55 (12), 43 (22), 41 (16).

HRMS (ESI +): *m/z*: [M+Na]⁺ gef.: 223.16701, ber.: 223.16740.

6.4.20 (*R*)-3,9-Dimethyldecansäuremethylester (31)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.4** wurde der ungesättigte Ester **92** (1.0 g, 5.04 mmol) mit Hilfe des (*R*)-Tol-BINAP-Katalysators (**82**) (0.25 g, 0.37 mmol) und Methylmagnesiumbromid (7.6 mL, 22.68 mmol) enantioselektiv alkyliert.

Ausbeute: 0.79 g (3.7 mmol), 74%, 99% ee (GC), [α]_D^{24.7} = +5.4 (c = 1.38 in CH₂Cl₂).

DC: *R_f*: 0.35 (Pentan/Et₂O 30:1).

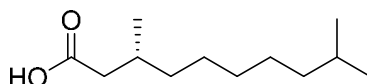
GC: $R_I = 1426$ (HP-5ms).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.86 (d, $J = 6.5$ Hz, 6 H, 2 x CH_3), 0.93 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.12 – 1.17 (m, 2 H, CH_2), 1.24 – 1.28 (m, 8 H, 4 x CH_2), 1.46 – 1.56 (m, 1 H, CH), 1.90 – 1.98 (m, 1 H, CH), 2.11 (dd, $J = 14.7, 8.1$ Hz, 1 H, CH_2), 2.31 (dd, $J = 14.8, 6.0$ Hz, 1 H, CH_2), 3.67 (s, 3 H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 19.7 (s, CH_3), 22.6 (s, 2 x CH_3), 26.9 (s, CH_2), 27.3 (s, CH_2), 27.9 (s, CH), 30.0 (s, CH_2), 30.3 (s, CH), 36.7 (s, CH_2), 39.0 (s, CH_2), 41.7 (s, CH_2), 51.3 (s, CH_3), 173.8 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%): 214 (5) [M^+], 199 (5), 183 (10), 171 (8), 157 (12), 102 (8), 101 (90), 97 (7), 87 (9), 83 (10), 75 (23), 74 (100), 73 (8), 71 (6), 69 (24), 59 (16), 57 (14), 55 (24), 43 (33), 42 (8), 41 (29).

6.4.21 (*R*)-3,9-Dimethyldecansäure (**94**)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.3** wurde der Ester **31** (0.7 g, 3.28 mmol) mit LiOH (1.6 g, 65.64 mmol) in einem THF/MeOH/ H_2O Gemisch (2:2:1, 74 mL) verseift. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte die gewünschte Säure **94** als klare Flüssigkeit.

Ausbeute: 0.28 g (1.43 mmol), 43%, $[\alpha]_D^{24.7} = +6.9$ ($c = 1.44$ in CH_2Cl_2).

DC: R_f 0.13 (Pentan/Ethylacetat 20:1).

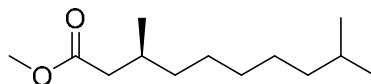
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.86 (d, $J = 6.5$ Hz, 6 H, 2 x CH_3), 0.97 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.12 – 1.17 (m, 2 H, CH_2), 1.21 – 1.34 (m, 8 H, 4 x CH_2), 1.51 (dquin, $J = 13.3, 6.6$ Hz, 1 H, CH), 1.93 – 1.99 (m, 1 H, CH), 2.15 (dd, $J = 14.9, 8.1$ Hz, 1 H, CH_2), 2.36 (dd, $J = 15.1, 6.0$ Hz, 1 H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 19.7 (s, CH_3), 22.6 (s, 2 x CH_3), 26.9 (s, CH_2), 27.4 (s, CH_2), 28.0 (s, CH), 30.0 (s, CH_2), 30.2 (s, CH), 36.7 (s, CH_2), 39.0 (s, CH_2), 41.4 (s, CH_2), 178.7 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%): als MSTFA-Derivat: 272 (5) [M^+], 259 (8), 258 (29), 257 (100), 160 (6), 159 (40), 145 (18), 143 (39), 133 (9), 132 (39), 129 (7), 118 (12), 117 (87), 116 (10), 75 (52), 74 (8), 73 (59), 69 (17), 57 (6), 55 (11), 43 (21), 41 (16).

HRMS (ESI +): *m/z*: [$M+Na$] $^+$ gef.: 223.16692, ber.: 223.16740.

6.4.22 (S)-3,9-Dimethyldecansäuremethylester (**93**)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.4** wurde der ungesättigte Ester **92** (1.0 g, 5.04 mmol) mit Hilfe des (S)-Tol-BINAP-Katalysators (**83**) (0.25 g, 0.37 mmol) und Methylmagnesiumbromid (7.6 mL, 22.68 mmol) enantioselektiv alkyliert.

Ausbeute: 0.85 g (4.0 mmol), 79%, 98% ee (GC), $[\alpha]_D^{24.7} = -5.6$ ($c = 1.33$ in CH_2Cl_2).

DC: R_f 0.37 (Pentan/ Et_2O 30:1).

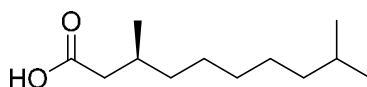
GC: RI = 1426 (HP-5ms).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 6 H, 2 x CH_3), 0.93 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H, CH_3), 1.12 – 1.17 (m, 2 H, CH_2), 1.24 – 1.32 (m, 8 H, 4 x CH_2), 1.46 – 1.54 (m, 1 H, CH), 1.92 – 1.98 (m, 1 H, CH), 2.11 (dd, $J = 14.7, 8.2$ Hz, 1 H, CH_2), 2.31 (dd, $J = 14.7, 6.0$ Hz, 1 H, CH_2), 3.67 (s, 3 H, CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 19.7 (s, CH_3), 22.6 (s, 2 x CH_3), 26.9 (s, CH_2), 27.3 (s, CH_2), 27.9 (s, CH), 30.0 (s, CH_2), 30.3 (s, CH), 36.7 (s, CH_2), 39.0 (s, CH_2), 41.7 (s, CH_2), 51.3 (s, CH_3), 173.8 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%): 214 (5) [M^+], 199 (6), 183 (11), 171 (8), 157 (13), 102 (8), 101 (96), 97 (7), 87 (10), 83 (11), 75 (23), 74 (100), 73 (8), 71 (6), 69 (24), 59 (17), 57 (13), 55 (23), 43 (31), 42 (8), 41 (27).

6.4.23 (S)-3,9-Dimethyldecansäure (95)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.3** wurde der Ester **93** (0.8 g, 3.75 mmol) mit LiOH (1.8 g, 75.01 mmol) in einem THF/MeOH/H₂O Gemisch (2:2:1, 84 mL) verseift. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte die gewünschte Säure **95** als klare Flüssigkeit.

Ausbeute: 0.27 g (1.36 mmol), 36%, $[\alpha]_D^{24.7} = -6.1$ ($c = 1.52$ in CH₂Cl₂).

DC: R_f 0.14 (Pentan/Ethylacetat 20:1).

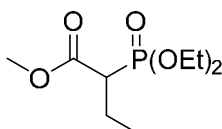
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.86 (d, $J = 6.5$ Hz, 6 H, 2 x CH₃), 0.97 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H, CH₃), 1.12 – 1.17 (m, 2 H, CH₂), 1.24 – 1.34 (m, 8 H, 4 x CH₂), 1.51 (dquin, $J = 13.2, 6.6$ Hz, 1 H, CH), 1.93 – 1.99 (m, 1 H, CH), 2.15 (dd, $J = 14.9, 8.1$ Hz, 1 H, CH₂), 2.36 (dd, $J = 15.1, 6.0$ Hz, 1 H, CH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 19.7 (s, CH₃), 22.6 (s, 2 x CH₃), 26.9 (s, CH₂), 27.4 (s, CH₂), 28.0 (s, CH), 30.0 (s, CH₂), 30.2 (s, CH), 36.7 (s, CH₂), 39.0 (s, CH₂), 41.4 (s, CH₂), 178.6 (s, CH_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%): als MSTFA-Derivat: 272 (4) [M⁺], 259 (8), 258 (28), 257 (100), 160 (6), 159 (40), 145 (18), 143 (40), 133 (10), 132 (40), 129 (7), 118 (12), 117 (92), 116 (10), 75 (55), 74 (8), 73 (63), 69 (18), 57 (6), 55 (12), 43 (23), 41 (17).

HRMS (ESI +): m/z : [M+Na]⁺ gef.: 223.16697, ber.: 223.16740.

6.4.24 2-Diethylphosphonobutansäuremethylester (98)



Es wurden 2-Brombutansäuremethylester (**97**) (7.6 mL, 66 mmol, 1.1 Äq) und Triethylphosphit (10.3 mL, 60 mmol, 1.0 Äq) auf 110°C erhitzt.^[77] Dabei wurde das entstehende Ethylbromid kontinuierlich abdestilliert. Das Rohprodukt wurde im Vakuum destilliert. Das gewünschte Produkt **98** wurde als klare Flüssigkeit erhalten.

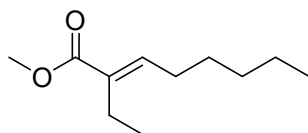
Ausbeute: 11.26 g (47.30 mmol), 79%.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.98 (td, *J* = 7.3, 0.9 Hz, 3 H, CH₃), 1.31 – 1.35 (m, 6 H, 2 x CH₃), 1.89 – 2.04 (m, 2 H, CH₂), 2.84 – 2.93 (m, 1 H, CH), 3.76 (s, 3 H, CH₃), 4.11 – 4.20 (m, 4 H, 2 x CH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 13.0 (d, *J* = 15.7 Hz, CH₃), 16.3 (dd, *J* = 5.8 Hz, 3.4, 2 x CH₃), 20.7 (d, *J* = 4.8 Hz, CH₂), 47.3 (d, *J* = 131.6 Hz, CH), 52.3 (s, CH₃), 62.6 (dd, *J* = 9.8, 6.6 Hz, 2 x CH₂), 169.7 (s, C_q).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%): [M⁺] fehlt, 223 (44), 211 (15), 210 (100), 207 (51), 193 (25), 183 (96), 179 (77), 166 (15), 165 (14), 155 (66), 152 151 (46), 138 (72), 137 (41), 123 (82), 122 (18), 113 (16), 111 (40), 110 (12), 109 (48), 105 (24), 102 (12), 95 (28), 91 (22), 87 (27), 82 (17), 81 (45), 74 (10), 69 (44), 65 (23), 59 (12), 55 (28), 41 (23).

6.4.25 (*E*)-2-Ethyl-2-octensäuremethylester (**32**)



Eine Lösung aus 2-Diethylphosphonobutansäuremethylester (**98**) (3.0 g, 12.6 mmol, 1.1 Äq), 18-Krone-6 (3.03 g, 11.50 mmol, 1 Äq) und THF (210 mL) wurde auf –78°C gekühlt und mit KHMDS-Lösung (1 M in THF, 11.50 mL, 11.50 mmol, 1 Äq) versetzt.^[78] Anschließend wurde frisch destilliertes Hexanal (**99**) (1.4 mL, 11.50 mmol, 1 Äq) zugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht gerührt, wobei es sich auf RT erwärmte. Zur Beendigung der Reaktion wurde gesättigte NH₄Cl-Lösung (210 mL) hinzugefügt und die wässrige Phase dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte den gewünschten Ester **32** als klare Flüssigkeit.

Ausbeute: *E*-Diastereomer: 0.91 g (4.96 mmol), 43%.

DC: *R_f*: 0.20 (*E*) und 0.29 (*Z*) (Pentan/Et₂O 50:1).

GC: *I* = 1302 (HP-5ms).

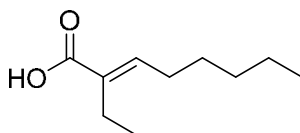
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3 H, CH₃), 1.0 (t, *J* = 7.5 Hz, 3 H, CH₃), 1.29 – 1.35 (m, 4 H, 2 x CH₂), 1.40 – 1.48 (m, 2 H, CH₂), 2.17 (q,

$J = 7.4$ Hz, 2 H, CH₂), 2.31 (q, $J = 7.5$ Hz, 2 H, CH₂), 3.73 (s, 3 H, CH₃), 6.72 (t, $J = 7.7$ Hz, 1 H, CH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 13.9 (s, CH₃), 14.0 (s, CH₃), 20.0 (s, CH₂), 22.5 (s, CH₂), 28.3 (s, CH₂), 28.5 (s, CH₂), 31.6 (s, CH₂), 51.5 (s, CH₃), 133.7 (s, C_q), 142.5 (s, CH), 168.4 (s, C_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%): 184 (39) [M⁺], 169 (24), 153 (44), 141 (60), 115 (100), 113 (38), 109 (43), 102 (68), 96 (20), 95 (34), 87 (29), 83 (40), 81 (44), 69 (62), 67 (45), 59 (53), 55 (59), 41 (58).

6.4.26 (*E*)-2-Ethyl-2-octensäure (96)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.3** wurde der Ester **32** (0.84 g, 4.58 mmol) mit LiOH (2.2 g, 91.52 mmol) in einem THF/MeOH/H₂O Gemisch (2:2:1, 88 mL) verseift. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte die gewünschte Säure **96** als leicht gelbe Flüssigkeit.

Ausbeute: 0.65 g (3.8 mmol), 83%.

DC: R_f 0.16 (Pentan/Ethylacetat 30:1).

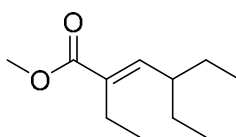
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.90 (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H, CH₃), 1.02 (t, $J = 7.5$ Hz, 3 H, CH₃), 1.29 – 1.35 (m, 4 H, 2 x CH₂), 1.43 – 1.49 (m, 2 H, CH₂), 2.21 (q, $J = 7.5$ Hz, 2 H, CH₂), 2.31 (q, $J = 7.5$ Hz, 2 H, CH₂), 6.89 (t, $J = 7.5$ Hz, 1 H, CH).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 13.8 (s, CH₃), 14.0 (s, CH₃), 19.7 (s, CH₂), 22.5 (s, CH₂), 28.4 (s, CH₂), 28.5 (s, CH₂), 31.6 (s, CH₂), 133.2 (s, C_q), 145.2 (s, CH), 173.6 (s, C_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) als MSTFA-Derivat: 242 (17) [M⁺], 227 (100), 183 (29), 171 (29), 157 (15), 155 (13), 153 (12), 109 (31), 95 (11), 83 (11), 81 (13), 75 (26), 73 (63), 69 (13), 67 (11), 55 (13), 41 (14).

HRMS (ESI +): m/z : [M+Na]⁺ gef.: 193.11992, ber.: 193.12045.

6.4.27 (*E*)-2,4-Diethyl-2-hexensäuremethylester (**47**)



Eine Lösung aus 2-Diethylphosphonobutansäuremethylester (**98**) (2.5 g, 10.5 mmol, 1.1 Äq), 18-Krone-6 (2.53 g, 9.55 mmol, 1 Äq) und THF (175 mL) wurde auf -78°C gekühlt und mit KHMDS-Lösung (1 M in THF, 9.55 mL, 9.55 mmol, 1 Äq) versetzt. Anschließend wurde frisch destilliertes 2-Ethylbutanal (1.17 mL, 9.55 mmol, 1 Äq) auf einmal zugegeben.^[78] Das Gemisch wurde über Nacht gerührt, wobei es sich auf RT erwärmte. Zur Beendigung der Reaktion wurde gesättigte NH_4Cl -Lösung (175 mL) hinzugefügt und die wässrige Phase dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographisch Reinigung an Kieselgel lieferte den gewünschten Ester **47** als klare Flüssigkeit.

Ausbeute: *E*-Diastereomer: 0.55 g (3.0 mmol), 32%.

E/Z-Diastereomerengemisch: 0.86 g (4.69 mmol), 49%.

DC: R_f : 0.20 (*E*) und 0.27 (*Z*) (Pentan/ Et_2O 50:1).

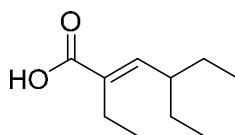
GC: R_I = 1234 (HP-5ms).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.84 (t, J = 7.5 Hz, 6 H, 2 x CH_3), 1.01 (t, J = 7.4 Hz, 3 H, CH_3), 1.19 – 1.31 (m, 4 H, 2 x CH_2), 2.16 – 2.25 (m, 1 H, CH), 2.31 (q, J = 7.4 Hz, 2 H, CH_2), 3.74 (s, 3 H, CH_3), 6.43 (d, J = 10.8 Hz, 1 H, CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 11.9 (s, 2 x CH_3), 14.1 (s, CH_3), 20.3 (s, CH_2), 27.7 (s, 2 x CH_2), 42.0 (s, CH), 51.5 (s, CH_3), 133.8 (s, C_q), 146.9 (s, CH), 168.5 (s, C_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%): 184 (48) [M^+], 169 (38), 155 (41), 153 (36), 137 (39), 124 (47), 123 (37), 115 (43), 109 (31), 102 (24), 101 (32), 95 (100), 87 (12), 85 (29), 83 (24), 81 (33), 79 (22), 69 (27), 67 (33), 59 (36), 55 (55), 53 (20), 41 (34).

6.4.28 (E)-2,4-Diethyl-2-hexensäure (72)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.3** wurde der Ester **47** (0.5 g, 2.72 mmol) mit LiOH (1.3 g, 54.3 mmol) in einem THF/MeOH/H₂O Gemisch (2:2:1, 60 mL) verseift. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte die gewünschte Säure **72** als leicht gelbe Flüssigkeit.

Ausbeute: 0.33 g (1.92 mmol), 71%.

DC: R_f 0.1 (Pentan/Ethylacetat 30:1).

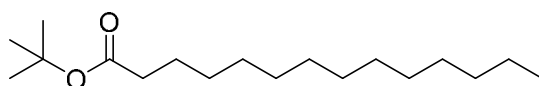
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.85 (t, *J* = 7.4 Hz, 6 H, 2 x CH₃), 1.04 (t, *J* = 7.4 Hz, 3 H, CH₃), 1.26 – 1.35 (m, 4 H, 2 x CH₂), 2.21 – 2.28 (m, 1 H, CH), 2.32 (q, *J* = 7.4 Hz, 2 H, CH₂), 6.6 (d, *J* = 10.8 Hz, 1 H, CH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 11.9 (s, 2 x CH₃), 14.1 (s, CH₃), 20.4 (s, CH₂), 27.7 (s, 2 x CH₂), 42.2 (s, CH), 51.5 (s, CH₃), 133.4 (s, C_q), 146.1 (s, CH), 173.2 (s, C_q).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) als MSTFA-Derivat: 242 (37) [M⁺], 227 (100), 213 (21), 197 (16), 183 (14), 171 (8), 157 (18), 137 (57), 124 (30), 123 (31), 109 (24), 95 (44), 83 (14), 81 (17), 79 (10), 75 (30), 73 (79), 55 (23).

HRMS (ESI +): *m/z*: [M+Na]⁺ gef.: 193.11997, ber.: 193.12045.

6.4.29 Tetradekansäure-*tert*-butylester (100)



Zu einer Lösung aus Kalium-*tert*-butanolat (5.0 g, 44.6 mmol, 1.2 Äq) in Diethylether (116 mL) wurde Tetradekansäuremethylester (**35**) (10.53 mL, 37.1 mmol, 1 Äq) gelöst in Diethylether (37 mL) langsam hinzugeotropft.^[81] Das Gemisch wurde für 45 Minuten bei RT gerührt. Anschließend wurde die doppelte Menge Eiswasser und Ethylacetat (200 mL) hinzugegeben. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über

Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte den gewünschten Ester **100** als klare Flüssigkeit.

Ausbeute: 7.02 g (24.72 mmol), 67%.

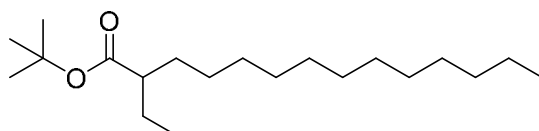
DC: R_f 0.32 (Pentan/Ethylacetat 50:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.88 (t, J = 6.7 Hz, 3 H, CH_3), 1.26 – 1.30 (m, 20 H, 10 x CH_2), 1.44 (s, 9 H, 3 x CH_3), 1.53 – 1.61 (m, 2 H, CH_2), 2.20 (t, J = 7.5 Hz, 2 H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.1 (s, CH_3), 22.7 (s, CH_2), 25.1 (s, CH_2), 28.1 (s, 3 x CH_3), 29.1 (s, CH_2), 29.3 (s, CH_2), 29.4 (s, CH_2), 29.5 (s, CH_2), 29.6 (s, CH_2), 29.6 (s, 2 x CH_2), 29.7 (s, CH_2), 31.9 (s, CH_2), 35.6 (s, CH_2), 79.9 (s, C_q), 173.3 (s, C_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%): $[\text{M}^+]$ fehlt, 229 (92), 228 (43), 211 (43), 185 (11), 129 (11), 111 (5), 97 (8), 85 (9), 83 (8), 73 (8), 71 (11), 69 (10), 57 (100), 56 (28), 55 (17), 43 (19), 41 (26).

6.4.30 2-Ethyltetradecansäure-*tert*-butylester (**101**)



Frisch destilliertes Diisopropylamin (3.8 mL, 26.98 mmol, 1.5 Äq) gelöst in THF (11 mL) wurde langsam zu einer Lösung von *n*-BuLi in Hexan (1.6 M, 11.25 mL, 18.0 mmol, 1 Äq) getropft.^[82] Nach 10 Minuten rühren wurden alle Lösungsmittel und flüchtigen Verbindungen unter Vakuum entfernt und der verbliebene Rückstand in THF (18 mL) gelöst. Die resultierende 1 M LDA Lösung wurde auf -78°C gekühlt und Tetradecansäure-*tert*-butylester (**100**) (5.24 g, 18.0 mmol, 1 Äq) gelöst in Hexan (3 mL) wurde langsam hinzuge tropft und für 20 Minuten gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus Ethyliodid (1.61 mL, 19.8 mmol, 1.1 Äq) und DMPU (0.66 mL) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht gerührt, wobei sie sich auf RT erwärmte. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter NH_4Cl -Lösung beendet. Das Gemisch wurde mit 2 M HCl angesäuert und dreimal mit Diethylether extrahiert.

Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO_3 - und NaCl -Lösung gewaschen und daraufhin über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte den gewünschten Ester **101** als gelbe Flüssigkeit.

Ausbeute: 1.93 g (6.17 mmol), 35%.

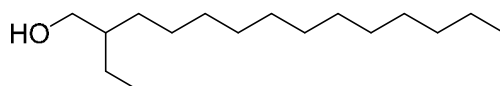
DC: R_f 0.45 (Pentan/ Et_2O 50:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.81 (t, J = 6.9 Hz, 3 H, CH_3), 0.82 (t, J = 7.4 Hz, 3 H, CH_3), 1.18 (s, 9 H, 3 x CH_3), 1.34 – 1.40 (m, 20 H, 10 x CH_2), 1.44 – 1.53 (m, 4 H, 2 x CH_2), 2.05 (tt, J = 8.9, 5.2 Hz, 1 H, CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 11.8 (s, CH_3), 14.1 (s, CH_3), 22.7 (s, CH_2), 25.7 (s, CH_2), 27.4 (s, CH_2), 28.2 (s, 3 x CH_3), 29.4 (s, CH_2), 29.5 (s, CH_2), 29.6 (s, CH_2), 29.6 (s, CH_2), 29.6 (s, 2 x CH_2), 29.7 (s, CH_2), 31.9 (s, CH_2), 32.3 (s, CH_2), 48.2 (s, CH), 79.7 (s, C_q), 175.9 (s, C_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%): $[\text{M}^+]$ fehlt, 257 (27), 239 (8), 101 (5), 99 (3), 97 (4), 88 (35), 85 (6), 83 (5), 71 (8), 69 (8), 57 (100), 56 (19), 55 (13), 43 (12), 41 (20).

6.4.31 2-Ethyl-1-tetradecanol (**102**)



Eine Lösung des Esters **101** (3.0 g, 9.6 mmol, 1 Äq) in trockenem CH_2Cl_2 (130 mL) wurde bei -78°C langsam mit einer DIBAL-H-Lösung (1 M in Hexan, 29 mL, 28.8 mmol, 3 Äq) versetzt und das Reaktionsgemisch langsam auf RT erwärmt.^[83] Nach vollständigem Umsatz des Esters (5h, DC-Kontrolle) wurde bei -5°C langsam MeOH und im Anschluss 2 M HCl-Lösung hinzugegeben. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte den gewünschten Alkohol **102**.

Ausbeute: 1.97 g (8.14 mmol), 84%.

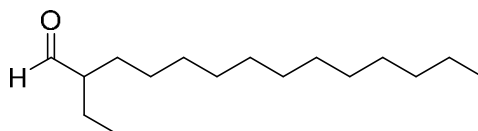
DC: R_f 0.31 (Pentan/ Et_2O 30:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.89 (m, 6 H, 2 x CH₃), 1.26 – 1.30 (m, 20 H, 10 x CH₂), 1.31 – 1.41 (m, 7 H, 3 x CH₂ 1 x CH), 3.54 (d, *J* = 5.1 Hz, 2 H, CH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 11.1 (s, CH₃), 14.1 (s, CH₃), 22.7 (s, CH₂), 23.4 (s, CH₂), 26.9 (s, CH₂), 29.4 (s, CH₂), 29.6 (s, 2 x CH₂), 29.7 (s, 3 x CH₂), 30.1 (s, CH₂), 30.5 (s, CH₂), 31.9 (s, CH₂), 42.0 (s, CH), 65.3 (s, CH₂).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%): 242 (3) [M⁺], 196 (4), 168 (2), 125 (18), 97 (60), 85 (51), 83 (56), 71 (79), 70 (60), 69 (50), 57 (100), 55 (68), 43 (69), 41 (49).

6.4.32 2-Ethyltetradecanal (**103**)



Der Alkohol **102** (1.9 g, 7.83 mmol, 1.0 Äq) wurde in trockenem CH₂Cl₂ (100 mL) und Triethylamin (11.0 mL, 78.3 mmol, 10.0 Äq) bei 0°C vorgelegt und mit einer 10-20 min vorher bei RT angesetzten Lösung des Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplexes (3.7 g, 23.5 mmol, 3.0 Äq) in trockenem DMSO (53 mL) versetzt.^[84] Nach vollständigem Umsatz des Alkohols (4h bei RT, DC-Kontrolle) wurde Wasser zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte den gewünschten Aldehyd **103**.

Ausbeute: 1.71 g (7.13 mmol), 91%.

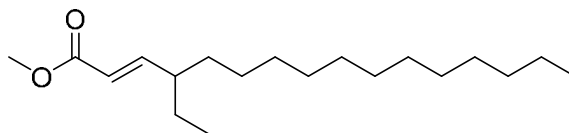
DC: *R_f*: 0.53 (Pentan/Et₂O 19:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3 H, CH₃), 0.91 (t, *J* = 7.5 Hz, 3 H, CH₃), 1.26 – 1.31 (m, 20 H, 10 x CH₂), 1.48 – 1.55 (m, 2 H, CH₂), 1.60 – 1.69 (m, 2 H, CH₂), 2.17 (td, *J* = 5.3, 2.8 Hz, 1 H, CH), 9.57 (d, *J* = 3.0 Hz, 1 H, CH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 11.4 (s, CH₃), 14.1 (s, CH₃), 21.9 (s, CH₂), 22.7 (s, CH₂), 27.1 (s, CH₂), 28.5 (s, CH₂), 29.3 (s, CH₂), 29.4 (s, CH₂), 29.6 (s, CH₂), 29.6 (s, 2 x CH₂), 29.7 (s, CH₂), 29.7 (s, CH₂), 53.5 (s, CH), 205.6 (s, CH).

MS (EI, 70 eV): m/z (%): $[M^+]$ fehlt, 184 (3), 168 (2), 109 (3), 96 (5), 95 (6), 85 (9), 82 (6), 72 (100), 71 (11), 69 (8), 57 (25), 55 (14), 43 (19), 41 (15).

6.4.33 4-Ethyl-2-hexadecensäuremethylester (**104**)



Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.1** aus (Methoxycarbonylmethylen)-triphenylphosphoran (2.7 g, 8.1 mmol) und 2-Ethyltetradeccanal (**103**) (1.71 g, 7.13 mmol) in CH_2Cl_2 (80 mL). Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte den gewünschten Ester **104**.

Ausbeute: 1.85 g (6.25 mmol), 88%.

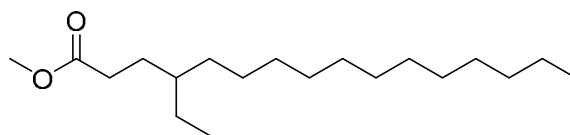
DC: R_f 0.34 (Pentan/ Et_2O 100:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.83 – 0.90 (m, 6 H, 2 x CH_2), 1.03 – 1.04 (m, 2 H, CH_2), 1.19 – 1.37 (m, 20 H, 10 x CH_2), 1.43 – 1.50 (m, 2 H, CH_2), 2.00 – 2.09 (m, 1 H, CH), 3.73 (s, 3 H, CH_3), 5.78 (dd, J = 15.6, 0.8 Hz, 1 H, CH), 6.74 (dd, J = 15.6, 9.3 Hz, 1 H, CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 11.9 (s, CH_3), 14.0 (s, CH_3), 22.7 (s, CH_2), 27.2 (s, CH_2), 27.2 (s, CH_2), 29.4 (s, CH_2), 29.6 (s, CH_2), 29.6 (s, 2x CH_2), 29.7 (s, CH_2), 29.7 (s, CH_2), 31.9 (s, CH_2), 34.1 (s, CH_2), 44.4 (s, CH), 51.4 (s, CH_3), 120.7 (s, CH), 154.0 (s, CH), 167.2 (C_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%): 296 (3) $[M^+]$, 265 (13), 235 (9), 222 (9), 142 (74), 141 (24), 128 (18), 127 (17), 124 (26), 113 (15), 111 (25), 110 (100), 109 (21), 97 (23), 96 (15), 95 (32), 87 (30), 83 (27), 82 (41), 81 (35), 74 (14), 71 (16), 69 (26), 67 (21), 57 (19), 55 (40), 43 (29), 41 (32).

6.4.34 4-Ethylhexadecansäuremethylester (36)



Das Alken **104** (1.85 g, 6.25 mmol, 1.0 Äq) wurde in Ethylacetat (40 mL) gelöst und mit PtO₂ (0.14 g, 0.63 mmol, 0.1 Äq) versetzt.^[85] Das Gemisch wurde 2 Stunden unter Wasserstoffatmosphäre bei 1 bar gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung über eine kurze Silikagel-Säule filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte den gewünschten Ester **36**.

Ausbeute: 1.59 g (5.33 mmol), 85%.

DC: R_f 0.30 (Pentan/Et₂O 100:1).

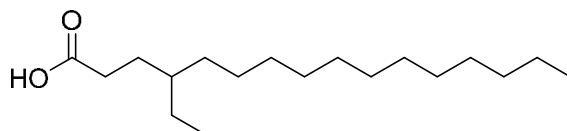
GC: I = 2055 (HP-5ms).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.85 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH₃), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.26 – 1.32 (m, 25 H, 12 x CH₂, 1 x CH), 1.56 – 1.61 (m, 2 H, CH₂), 2.26 – 2.30 (m, 2 H, CH₂), 3.67 (s, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 10.7 (s, CH₃), 14.1 (s, CH₃), 22.7 (s, CH₂), 25.6 (s, CH₂), 26.6 (s, CH₂), 28.3 (s, CH₂), 29.4 (s, CH₂), 29.7 (s, CH₂), 29.7 (s, 4 x CH₂), 30.1 (s, CH₂), 31.6 (s, CH₂), 31.9 (s, CH₂), 32.8 (s, CH₂), 38.5 (s, CH), 51.5 (s, CH₃), 174.7 (s, C_q).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%): 298 (4) [M⁺], 269 (9), 227 (46), 225 (19), 129 (9), 97 (17), 87 (100), 85 (15), 83 (12), 74 (38), 71 (19), 69 (24), 57 (23), 55 (22), 43 (21), 41 (16).

6.4.35 4-Ethylhexadecansäure (73)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift **6.3.3** wurde der Ester **36** (1.59 g, 5.33 mmol) mit LiOH (2.5 g, 104.38 mmol) in einem THF/MeOH/H₂O Gemisch (2:2:1, 133 mL) verseift. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel lieferte die gewünschte Säure **73** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 1.23 g (4.33 mmol), 91%.

DC: R_f 0.22 (Pentan/Ethylacetat 10:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.85 (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H, CH_3), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3 H, CH_3), 1.26 – 1.32 (m, 25 H, 12 x CH_2 , 1 x CH), 1.58 – 1.63 (m, 2 H, CH_2), 2.30 – 2.34 (m, 2 H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 10.7 (s, CH_3), 14.1 (s, CH_3), 22.7 (s, CH_2), 25.5 (s, CH_2), 26.6 (s, CH_2), 28.0 (s, CH_2), 29.4 (s, CH_2), 29.7 (s, CH_2), 29.7 (s, 4 x CH_2), 30.1 (s, CH_2), 31.6 (s, CH_2), 31.9 (s, CH_2), 32.8 (s, CH_2), 38.4 (s, CH), 180.7 (s, C_q).

MS (EI, 70 eV): m/z (%): 284 (16) [M^+], 255 (27), 225 (34), 213 (100), 155 (11), 141 (13), 127 (15), 115 (25), 113 (18), 99 (25), 97 (37), 85 (50), 83 (27), 73 (91), 71 (59), 70 (20), 69 (51), 60 (16), 57 (59), 55 (48), 43 (43), 41 (35).

HRMS (ESI $-$): m/z : [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ gef.: 285.27886, ber.: 285.27936.

7 Literaturverzeichnis

- [1] C. J. Burgin, J. P. Colella, P. L. Kahn, N. S. Upham, *J. Mammal.* **2018**, 99, 1.
- [2] T. Fitch in *Encyclopedia of Language & Linguistics*, Elsevier, **2006**, pp. 115–121.
- [3] W. L. Brown, T. Eisner, R. H. Whittaker, *BioScience* **1970**, 20, 21.
- [4] A. Gossauer, *Struktur und Reaktivität der Biomoleküle. Eine Einführung in die organische Chemie*, Verl. Helvetica Chimica Acta, Zürich, **2006**.
- [5] P. Karlson, M. Lüscher, *Nature* **1959**, 183, 55.
- [6] P. J. Apps, P. J. Weldon, M. Kramer, *Nat. Prod. Rep.* **2015**, 32, 1131.
- [7] R. L. S. Patterson, *J. Sci. Food Agric.* **1968**, 19, 31.
- [8] R. L. S. Patterson, *J. Sci. Food Agric.* **1968**, 19, 434.
- [9] H.C.B. Reed, D. R. Melrose, R.L.S. Patterson, *Br. Vet. J.* **1974**, 130, 61.
- [10] B. Schaal, G. Coureaud, D. Langlois, C. Giniès, E. Sémon, G. Perrier, *Nature* **2003**, 424, 68.
- [11] A. B. Clark, *J. Chem. Ecol.* **1982**, 8, 1133.
- [12] R. M. Crewe, B. V. Burger, M. Le Roux, Z. Katsir, *J. Chem. Ecol.* **1979**, 5, 861.
- [13] Z. Katsir, R. M. Crewe, *S. Afr J. Zool.* **1980**, 15, 249.
- [14] B. L. Nielsen, N. Jérôme, A. Saint-Albin, C. Thonat, C. Briant, F. Boué, O. Rampin, Y. Maurin, *Behav. Brain Res.* **2011**, 225, 584.
- [15] S. Takács, R. Gries, H. Zhai, G. Gries, *Angew. Chem.* **2016**, 128, 6166.
- [16] L.E.L. Rasmussen, T. D. Lee, A. Zhang, W. L. Roelofs, G.D. Daves, *Chem. Senses* **1997**, 22, 417.
- [17] L.E.L. Rasmussen, J. Lazar, D. R. Greenwood, *Biochim. Soc. Trans.* **2003**, 31, 137.
- [18] M. Hildebrand, G. E. Goslow, *Vergleichende und funktionelle Anatomie der Wirbeltiere*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2004**.

- [19] M. F. Bear, B. W. Connors, M. A. Paradiso, *Neurowissenschaften. Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie*, Springer Spektrum, Berlin, **2018**.
- [20] W. A. Müller, S. Frings, *Tier- und Humanphysiologie. Eine Einführung*, Springer, Berlin, **2009**.
- [21] E. B. Keverne, *Science* **1999**, 286, 716.
- [22] D. M. Stoddart, *The Ecology of Vertebrate Olfaction*, Springer Netherlands, Dordrecht, **1980**.
- [23] P. Pageat, E. Gaultier, *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **2003**, 33, 187.
- [24] G. Verberne, *Z. Tierpsychol.* **1976**, 42, 113.
- [25] R. E. Brown, D. W. Macdonald (Eds.) *Social odours in mammals*, Oxford: Clarendon Press, Oxford, **1985**.
- [26] P. Pageat in *Proceedings of the XX1st Congress of the World Small Animal Veterinary Association* (Eds.: D. Johnston, Waner T.), Jerusalem, **1996**.
- [27] P. Pageat, Y. Tessier in *Proceedings of the First International Conference on Veterinary Behavioural Medicine* (Eds.: D. S. Mills, S. E. Heath, L. J. Harrington), Birmingham, **1997**, p. 64.
- [28] D. W. Macdonald in *Social odours in mammals* (Eds.: R. E. Brown, D. W. Macdonald), Oxford: Clarendon Press, Oxford, **1985**, pp. 619–622.
- [29] M. L. Gorman, B. J. Trowbridge in *Carnivore Behavior, Ecology, and Evolution* (Ed.: J. L. Gittleman), Springer US, Boston, MA, **1989**, pp. 57–88.
- [30] A. M. Shoieb, D. M. Hanshaw, *Vet. Pathol.* **2009**, 46, 677.
- [31] T. Miyazaki, T. Nishimura, T. Yamashita, M. Miyazaki, *J. Ethol.* **2018**, 36, 99.
- [32] H. N. Feldman, *Can. J. Zool.* **1994**, 72, 1093.
- [33] S. L. Crowell-Davis, T. M. Curtis, R. J. Knowles, *J. Feline Med. Surg.* **2004**, 6, 19.
- [34] M. Nakabayashi, R. Yamaoka, Y. Nakashima, *J. Ethol.* **2012**, 30, 325.

- [35] M. Miyazaki, T. Yamashita, Y. Suzuki, Y. Saito, S. Soeta, H. Taira, A. Suzuki, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1071.
- [36] M. Miyazaki, T. Miyazaki, T. Nishimura, W. Hojo, T. Yamashita, *J. Chem. Ecol.* **2018**, *44*, 364.
- [37] W. H. Hendriks, M. F. Tarttelin, P. J. Moughan, *Physiol. Behav.* **1995**, *58*, 467.
- [38] W. H. Hendriks, K. J. Rutherford-Markwick, K. Weidgraaf, C. Ugarte, Q. R. Rogers, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2008**, *92*, 53.
- [39] A. Yamane, Y. Ono, T. Doi, *J. Mammal. Soc. Japan* **1994**, *19*, 9.
- [40] L. P. Case, *The cat. Its behavior, nutrition & health*, Iowa State Press, Ames, Iowa, **2003**.
- [41] J. W. S. Bradshaw, *The behaviour of the domestic cat*, C.A.B. International, Wallingford, **1992**.
- [42] E. Natoli, *Behaviour* **1985**, *94*, 234.
- [43] A. E. Lisberg, C. T. Snowdon, *Anim. Behav.* **2011**, *81*, 757.
- [44] J. N. de Boer, *Behav. Processes* **1977**, *2*, 209.
- [45] S. P. Datte, H. Harris, *J. Physiol.* **1951**, *114*, 39-41 P.
- [46] R. G. Westall, *Biochem. J.* **1953**, *55*, 244.
- [47] W. H. Hendriks, P. J. Moughan, M. F. Tarttelin, A. D. Woolhouse, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *112*, 581.
- [48] J. Caspers, *"Identifizierung und Synthese Flehmen-induzierender Verbindungen der Hauskatze"*, Masterarbeit, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, **2012**.
- [49] "NIST Chemistry Webbook", can be found under <https://webbook.nist.gov/chemistry/>, **2017 (abgerufen am 2017)**.
- [50] G. A. Vernin, S. Chakib, G. M.F. Vernin, R. M. Zamkotsian, *J. Essent. Oil Res.* **2004**, *16*, 26.
- [51] W. F. Wood, *J. Chem. Ecol.* **2004**, *30*, 479.

- [52] B. V. Burger, D. Smit, H. S. C. Spies, C. Schmidt, U. Schmidt, A. Y. Telitsina, *J. Chem. Ecol.* **2001**, 27, 1277.
- [53] J. Sangeetha, K. Vijayalakshmi, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* **2011**, 116.
- [54] A. H. Goitom, "*Identification of the putative urinary intraspecific recognition of pheromone of the Caracal Caracal caracal*", Dissertation, University of Stellenbosch, South Africa, **2017**.
- [55] M. E. A. Fuchs, S. Franke, W. Francke, *Z. Angew. Entomol.* **1985**, 99, 499.
- [56] F. Bonadonna, E. Miguel, V. Grosbois, P. Jouventin, J.-M. Bessiere, *J. Chem. Ecol.* **2007**, 33, 1819.
- [57] R. P. Johnson, *Anim. Behav.* **1973**, 21, 521.
- [58] B. V. Burger, M. Z. Viviers, J. P. I. Bekker, M. Le Roux, N. Fish, W. B. Fourie, G. Weibchen, *J. Chem. Ecol.* **2008**, 34, 659.
- [59] P. Apps, L. Mmualefe, J. W. McNutt, *J. Chem. Ecol.* **2012**, 38, 1450.
- [60] T. Sugiyama, H. Sasada, J. Masaki, K. Yamashita, *Agric. Biol. Chem.* **1981**, 45, 2655.
- [61] N. M. Carballeira, M. Pagán, A. D. Rodríguez, *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 1049.
- [62] N. M. Carballeira, N. Montano, J. Vicente, A. D. Rodriguez, *Lipids* **2007**, 42, 519.
- [63] B. V. Burger, D. Smit, H. S. C. Spies, C. Schmidt, U. Schmidt, A. Y. Telitsina, G. R. Grierson, *J. Chem. Ecol.* **2001**, 27, 1259.
- [64] J. Asselineau, R. Ryhage, E. Stenhagen, J. Schliack, L. Reio, *Acta Chem. Scand.* **1957**, 11, 196.
- [65] R. Ryhage, E. Stenhagen, *Arkiv för Kemi* **1960**, 15, 291.
- [66] R. Ryhage, E. Stenhagen, *Arkiv för Kemi* **1960**, 15, 333.
- [67] S. Zhang, W. Duan, W. Wang, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 1228.
- [68] Y. Horiguchi, S. Matsuzawa, E. Nakamura, I. Kuwajima, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4025.

- [69] Z. Yang, X. Jin, M. Guaciaro, B. F. Molino, *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 3191.
- [70] S.-Y. Wang, T.-K. Lum, S.-J. Ji, T.-P. Loh, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350, 673.
- [71] S.-Y. Wang, T.-P. Loh, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 8694.
- [72] S. R. Harutyunyan, F. López, W. R. Browne, A. Correa, D. Peña, R. Badorrey, A. Meetsma, A. J. Minnaard, B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 9103.
- [73] S. Schulz, *Lipids* **2001**, 36, 637.
- [74] T. Nawrath, K. Gerth, R. Müller, S. Schulz, *Chem. Biodivers.* **2010**, 7, 2228.
- [75] P. E. Sonnet, *Synth. Commun.* **1976**, 6, 21.
- [76] L. I. Zakharkin, L. P. Sorokina, *J. Gen. Chem. USSR* **1967**, 37, 525.
- [77] A. Frieze, K. Hell-Momeni, I. Zündorf, T. Winckler, T. Dingermann, G. Dannhardt, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 1535.
- [78] W.C. Still, C. Gennari, *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 4405.
- [79] K. Stritzke, "*Sauerstoffheterozyklen und Amide aus tropischen Schmetterlingen und marinen Streptomycceten*", Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, **2003**.
- [80] J. Pospíšil, *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 2348.
- [81] V. A. Vasin, V. V. Razin, *Synlett* **2001**, 2001, 658.
- [82] K. Krückert, B. Flachsbarth, S. Schulz, U. Hentschel, P. J. Weldon, *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 863.
- [83] S. D. Tilley, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1080.
- [84] G. Tojo, M. Fernandez, *Oxidation of alcohols to aldehydes and ketones. A guide to current common practice*, Springer, New York, NY, **2006**.
- [85] H. Guthmann, D. Conole, E. Wright, K. Körber, D. Barker, M. A. Brimble, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2009, 1944.
- [86] U. Radespiel in *Developments in Primatology: Progress and Prospect* (Eds.: L. Gould, M. L. Sauther), Springer Science+Business Media, LLC, Boston, MA, **2007**, pp. 211–234.

- [87] R. M. Rasoloarison, D. W. Weisrock, A. D. Yoder, D. Rakotondravony, P. M. Kappeler, *Int. J. Primatol.* **2013**, 34, 455.
- [88] F. Ankel-Simons, *Primate anatomy. An introduction*, Elsevier Academic Press, Amsterdam, **2007**.
- [89] U. Radespiel, W. Reimann, M. Rahelinirina, E. Zimmermann, *Int. J. Primatol.* **2006**, 27, 311.
- [90] A. Schilling, J.-P. Richard, J. Servi re, *C. R. Acad. Sci.* **1999**, 322, 759.
- [91] D. Schwab, *Am. J. Primatol.* **2000**, 51, 41.
- [92] U. Radespiel, P. Ehresmann, E. Zimmermann, *Am. J. Primatol.* **2003**, 59, 139.
- [93] S. Atsalis, *A natural history of the brown mouse lemur*, Routledge, Taylor & Francis Group, London, **2016**.
- [94] J. Schmid, *Int. J. Primatol.* **2001**, 22, 1021.
- [95] A. Weidt, N. Hagenah, B. Randrianambinina, U. Radespiel, E. Zimmermann, *Am. J. Phys. Anthropol.* **2004**, 123, 40.
- [96] M. B. Blanco, *Int. J. Primatol.* **2008**, 29, 323.
- [97] D. Wrogemann, E. Zimmermann, *Zoo Biol.* **2001**, 20, 157.
- [98] M. Eberle, P. M. Kappeler, *Behav. Ecol. Sociobiol.* **2004**, 57, 77.
- [99] M. Eberle, P. M. Kappeler, *Behav. Ecol. Sociobiol.* **2004**, 57, 91.
- [100] M. Eberle, M. Perret, P. M. Kappeler, *Int. J. Primatol.* **2007**, 28, 1267.
- [101] M. Perret, H. Gachot-Neveu, M. Andr s, *Behaviour* **2001**, 138, 1047.
- [102] U. Radespiel, V. Dal Secco, C. Dr gem ller, P. Braune, E. Labes, E. Zimmermann, *Anim. Behav.* **2002**, 63, 259.
- [103] M. E. Pereira, R. Kaufman, P. M. Kappeler, D. J. Overdorff, *Folia Primatol.* **1990**, 55, 96.
- [104] S. Hohenbrink, F. Schaarschmidt, K. B nemann, S. Gerberding, E. Zimmermann, U. Radespiel, *Anim. Behav.* **2016**, 122, 145.

- [105] C. Schopf, E. Zimmermann, J. Tünsmeier, S. B. R. Kästner, P. Hubka, A. Kral, *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* **2014**, *15*, 993.
- [106] J. A. Cherry, M. K. Izard, E. L. Simons, *Am. J. Primatol.* **1987**, *13*, 181.
- [107] E. Zimmermann, E. Vorobieva, D. Wrogemann, T. Hafen, *Int. J. Primatol.* **2000**, *21*, 837.
- [108] P. Braune, S. Schmidt, E. Zimmermann, *Behav. Ecol. Sociobiol.* **2005**, *58*, 587.
- [109] C.D. Buesching, M. Heistermann, J.K. Hodges, E. Zimmermann, *Folia Primatol.* **1998**, *69*, 295.
- [110] M. Perret, Chemocommunication in the Reproductive Function of Mouse Lemurs in Alterman, Doyle et al. (Hg.) – *Creatures of the dark*, **2010**, pp. 377–392.
- [111] A. R. Glatston, Olfactory communication in the lesser mouse lemur (*Microcebus murinus*) in Seth PK, editor. *Perspectives in primate biology*. New Delhi (IN): Today & Tomorrow's printers & publishers, **1983**, pp. 63–73.
- [112] C. Evans, A. Schilling, The Accessory (Vomeronasal) Chemoreceptor System in Some Prosimians in Alterman, Doyle et al. (Hg.) – *Creatures of the dark*, **2010**, pp. 393–411.
- [113] A. Schilling, J. Serviere, G. Gendrot, M. Perret, *Exp. Brain Res.* **1990**, *81*, 609.
- [114] A. Schilling, M. Perret, J. Predine, *J. Endocrinol.* **1984**, *102*, 143.
- [115] M. Perret, *Z. Tierpsychol.* **1985**, *69*, 265.
- [116] R. A. Mittermeier, *Lemurs of Madagascar*, Conservation International, Arlington (Va), **2010**.
- [117] P. M. Kappeler, R. M. Rasoloarison, L. Razafimanantsoa, L. Walter, C. Roos, *Primate Report* **2005**, *71*, 1.
- [118] U. Radespiel, J. H. Ratsimbazafy, S. Rasoloharijaona, H. Raveloson, N. Andriaholinirina, R. Rakotondravony, R. M. Randrianarison, B. Randrianambinina, *Primates* **2012**, *53*, 157.
- [119] R. Sowada, *Z. Chem.* **1968**, *8*, 361.

- [120] M. Hesse, *Alkaloide. Fluch oder Segen der Natur ?*, Verl. Helvetica Chemica Acta, Zürich, **2000**.
- [121] S. Ekanayake Mudiyanse, M. Hamburger, P. Elsner, J. J. Thiele, *J. Invest. Dermatol.* **2003**, 120, 915.
- [122] D. Voet, J. D. Voet, *Biochemistry (second edition)*, John Wiley & Son's, **1995**.
- [123] J. Martín, I. Barja, P. López, *Biochem. Syst. Ecol.* **2010**, 38, 1096.
- [124] J. Delbarco-Trillo, B. A. Burkert, T. E. Goodwin, C. M. Drea, *J. Evol. Biol.* **2011**, 24, 82.
- [125] L.E.L. Rasmussen, T. E. Perrin, *Physiol. Behav.* **1999**, 67, 539.
- [126] B. V. Burger, R. Visser, A. Moses, M. Le Roux, *J. Chem. Ecol.* **2006**, 32, 1347.
- [127] K. Osada, M. Kashiwayanagi, H. Izumi, *Chem. Senses* **2009**, 34, 713.
- [128] E. S. Scordato, G. Dubay, C. M. Drea, *Chem. Senses* **2007**, 32, 493.
- [129] "Pherobase: Benzylacetat", can be found under <http://www.pherobase.com/database/compound/compounds-detail-benzyl%20acetate.php?is-valid=yes>, **2018 (abgerufen am 2018)**.
- [130] N. H. Willams, W. M. Whitten, *Biol. Bull.* **1983**, 164, 355.
- [131] L. A. Knapp, J. Robson, J. S. Waterhouse, *Am. J. Primatol.* **2006**, 68, 568.
- [132] J. M. Setchell, S. Vaglio, J. Moggi-Cecchi, F. Boscaro, L. Calamai, L. A. Knapp, *Chem. Senses* **2010**, 35, 205.
- [133] T. E. Smith, A. J. Tomlinson, J. A. Mlotkiewicz, D. H. Abbott, *Chem. Senses* **2001**, 26, 449.
- [134] "Pherobase: Limonen", can be found under <http://www.pherobase.com/database/compound/compounds-detail-limonene.php?isvalid=yes>, **2018 (abgerufen am 2018)**.
- [135] W. F. Wood, J. P. Copeland, R. E. Yates, I. K. Horsey, L. R. McGreevy, *Biochem. Syst. Ecol.* **2009**, 37, 574.
- [136] L. Hagey, E. MacDonald, *J. Chem. Ecol.* **2003**, 29, 1479.

- [137] J. X. Zhang, H. A. Soini, K. E. Bruce, D. Wiesler, S. K. Woodley, M. J. Baum, M. V. Novotny, *Chem. Senses* **2005**, *30*, 727.
- [138] B. V. Burger, T.-P. Yang, M. Le Roux, W. F. Brandt, A. J. Cox, P. F. Hart, *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 2383.
- [139] B. V. Burger, P. J. Pretorius, *Z. Naturforsch.* **1987**, 1355.
- [140] M. J. I. Mattina, J. J. Pignatello, R. K. Swihart, *J. Chem. Ecol.* **1991**, *17*, 451.
- [141] T. E. Goodwin, N. Songsasen, L. J. Broederdorf, B. A. Burkert, C. J. Chen, S. R. Jackson, K. B. Keplinger, M. E. Rountree, Z. J. Waldrip, M. E. Weddell et al. in *Chemical Signals in Vertebrates 12* (Eds.: M. L. East, M. Dehnhard), Springer New York; Imprint; Springer, New York, NY, **2013**, pp. 171–184.
- [142] M. Muñoz-Romo, L. T. Nielsen, J. M. Nassar, T. H. Kunz, *Acta Chiropt.* **2012**, *14*, 213.
- [143] W. L. F. Armarego, C. Chai Li Lin, *Purification of laboratory chemicals*, BH Butterworth-Heinemann/Elsevier, Amsterdam, **2013**.
- [144] H. G. O. Becker, R. Beckert, *Organikum. Organisch-chemisches Grundpraktikum*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [145] J. Glastrup, *J. Chromatogr. A* **1998**, *827*, 133.
- [146] J. Rodstein, J. G. Millar, J. D. Barbour, J. S. McElfresh, I. M. Wright, K. S. Barbour, A. M. Ray, L. M. Hanks, *J. Chem. Ecol.* **2011**, *37*, 114.
- [147] J. S. Dickschat, S. C. Wenzel, H. B. Bode, R. Müller, S. Schulz, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 778.

8 Anhang

8.1 Zusammenfassung der Diskriminanzanalyse

8.1.1 Diskriminanzanalyse Geschlechter

Tab. 10: Discriminant Function Analysis Summary (X1a_Factor coordinates of cases, based on correlations (reduced table for analyses 280617minus 2x_min_3m.sta) in analyses 280617.stw)

Step 10, N of vars in model: 10; Grouping: Sex (2 grps)

Wilks' Lambda: ,04290 approx. F (10,11)=24,539 p< ,0000

N = 22	Wilks'	Partial	F-remove	p-value	Toler.	1-Toler.
	(Lambda)	(Lambda)	((1,11))			((R-Sqr.))
Factor 1	0.401773	0.106787	92.00860	0.000001	0.166561	0.833440
Factor 3	0.303067	0.141567	66.70201	0.000005	0.191348	0.808652
Factor 5	0.227321	0.188738	47.28175	0.000027	0.231415	0.768585
Factor 10	0.106066	0.404504	16.19378	0.002002	0.431776	0.568224
Factor 12	0.069423	0.618012	6.79900	0.024366	0.634848	0.365153
Factor 2	0.067475	0.635854	6.29958	0.028992	0.651870	0.348130
Factor 13	0.054967	0.780550	3.09262	0.106399	0.790081	0.209919
Factor 14	0.053832	0.797006	2.80166	0.122333	0.805811	0.194189
Factor 4	0.052762	0.813163	2.52743	0.140190	0.821259	0.178741
Factor 8	0.049453	0.867579	1.67896	0.221592	0.873298	0.126702

8.1.2 Diskriminanzanalyse Arten

Tab. 11: Discriminant Function Analysis Summary (X1a_Factor coordinates of cases, based on correlations (reduced table for analyses 280617minus 2x_min_3m.sta) in analyses 280617.stw)

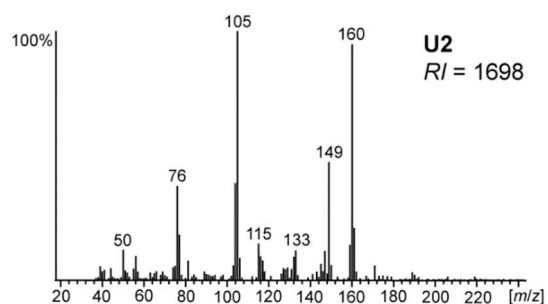
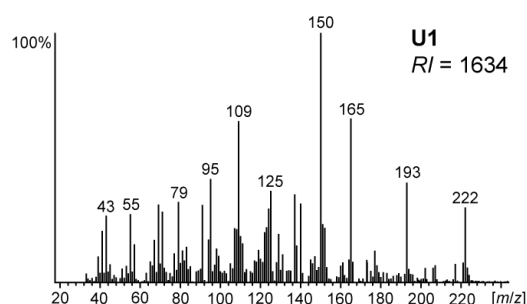
Step 7, N of vars in model: 7; Grouping: Species (2 grps)

Wilks' Lambda: ,11607 approx. F (7,14)=15,230 p< ,0000

N = 22	Wilks' (Lambda)	Partial (Lambda)	F-remove ((1,14))	p-value	Toler.	1-Toler. ((R-Sqr.))
Factor 2	0.652755	0.177823	64.73009	0.000001	0.383802	0.616198
Factor 6	0.252757	0.459234	16.48555	0.001170	0.531941	0.468059
Factor 5	0.207725	0.558790	11.05414	0.005009	0.615171	0.384830
Factor 3	0.163838	0.708472	5.76084	0.030859	0.744009	0.255992
Factor 10	0.145559	0.797439	3.55620	0.080245	0.821666	0.178334
Factor 1	0.137076	0.846790	2.53303	0.133807	0.864955	0.135045
Factor 15	0.136737	0.848893	2.49208	0.136743	0.866802	0.133198

8.2 Massenspektren der unbekannten Verbindungen in den Urinprofilen von männlichen und weiblichen Mausmakis

8.2.1 Männliche Mausmakis U1 – U3



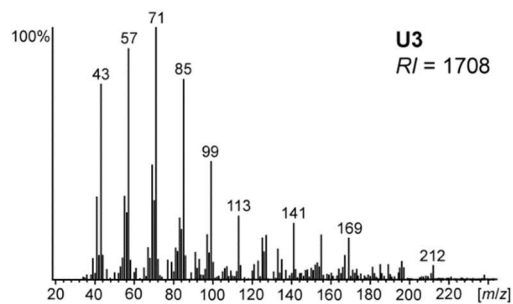
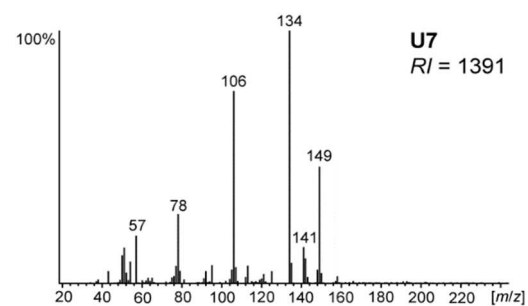
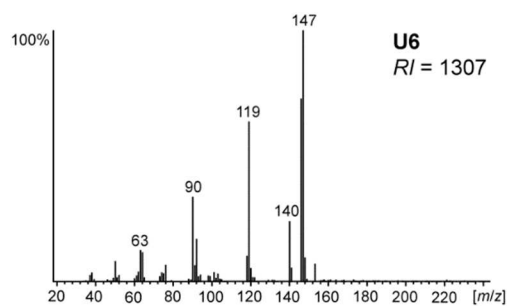
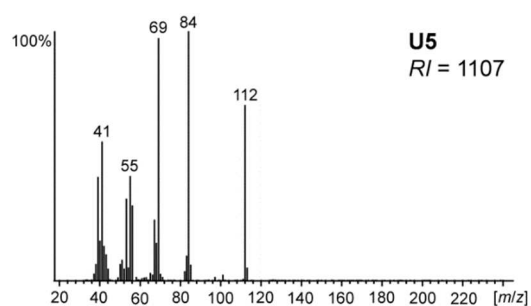
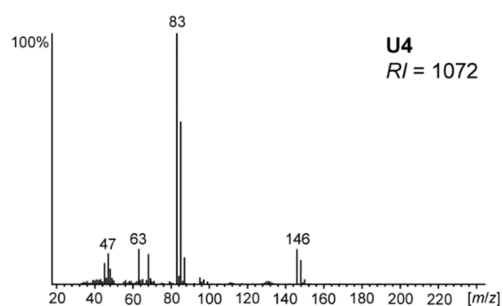
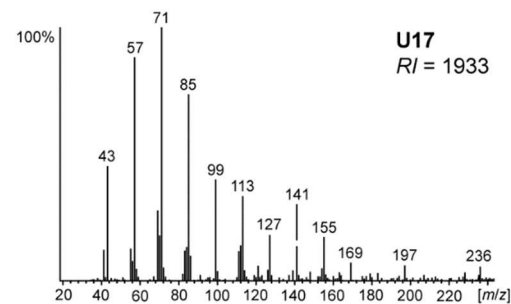
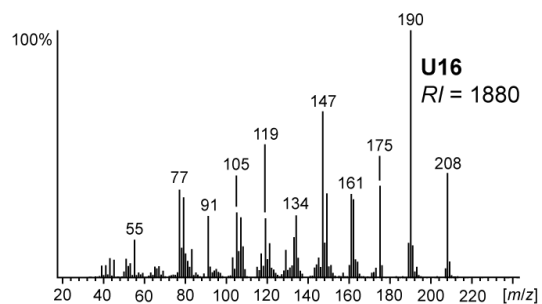
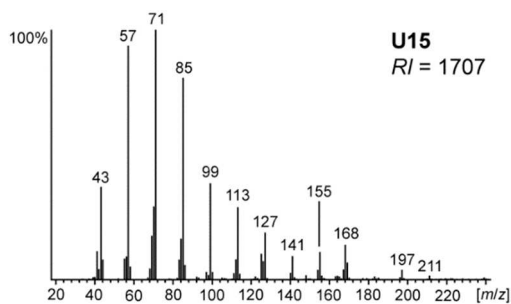
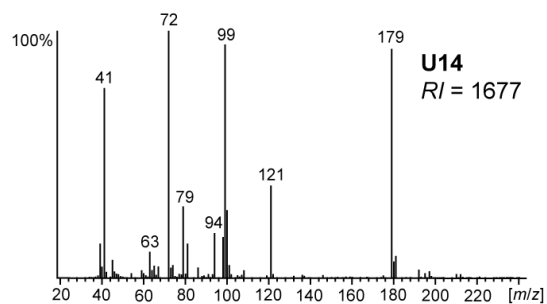
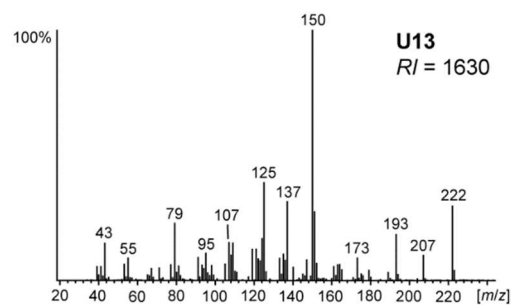
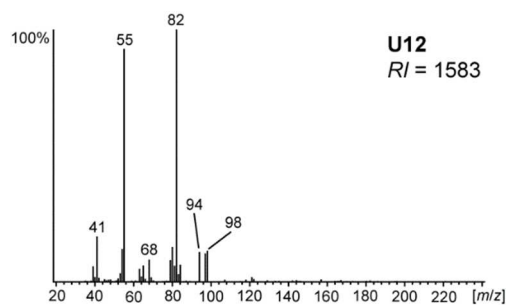
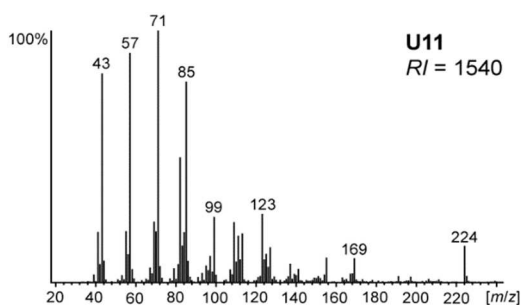
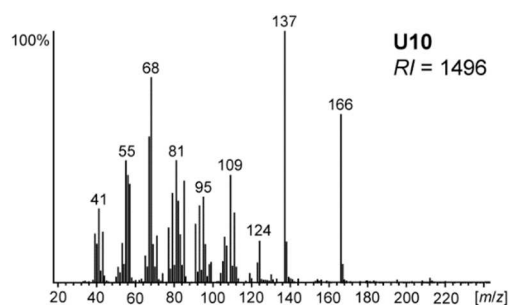
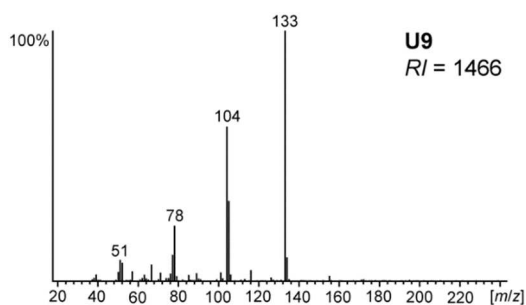
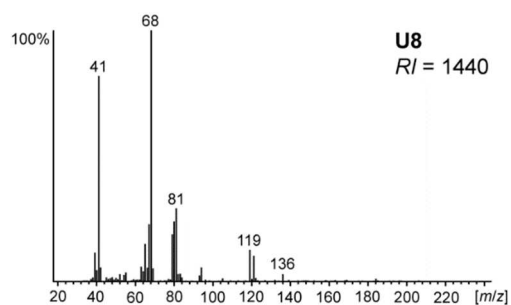


Abb. 54: Massenspektren der unbekannten Verbindungen **U1**, **U2**, **U3** aus dem Urinprofil der männlichen Mausmakis.

8.2.2 Weibliche Mausmakis U4 – U22





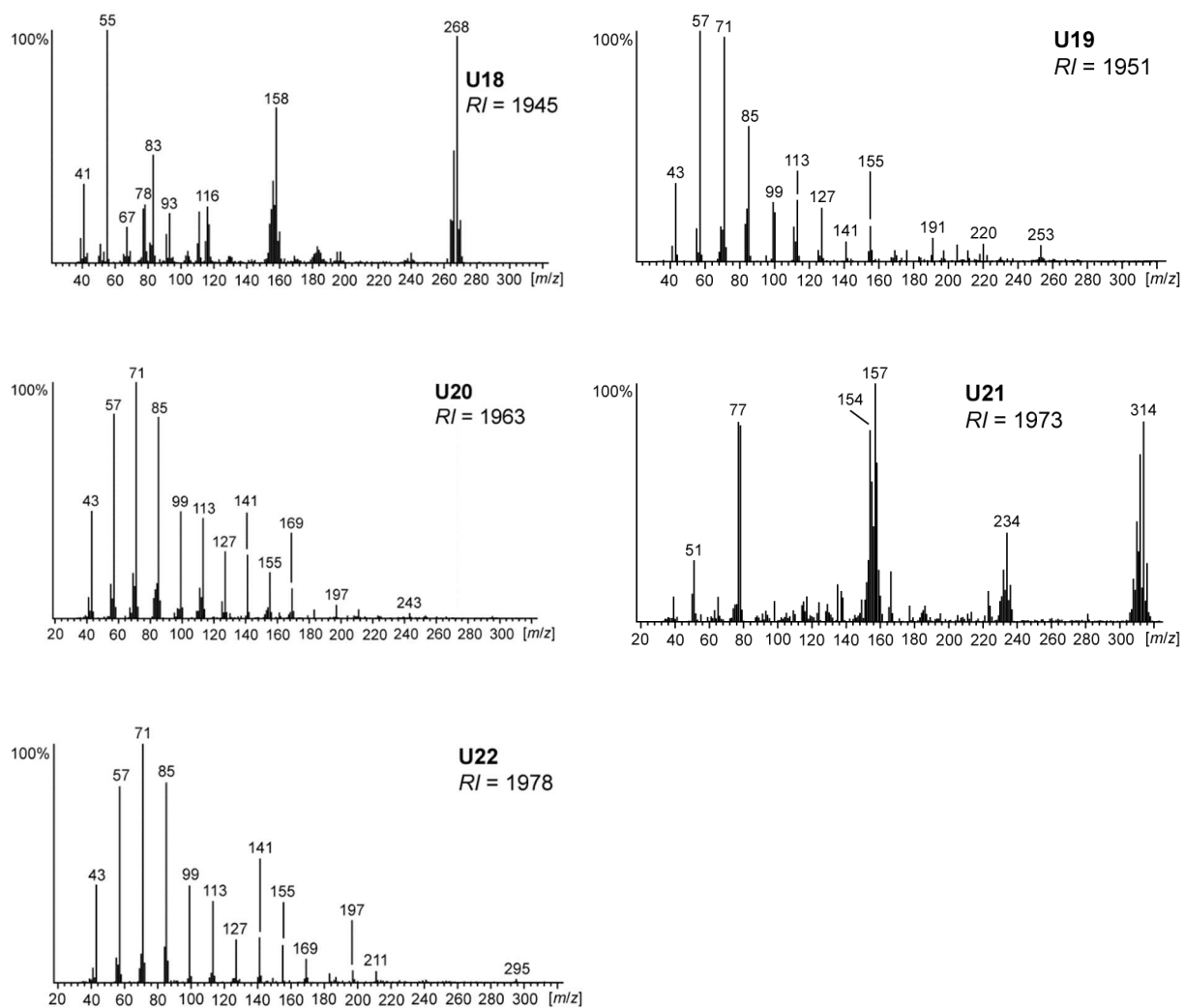


Abb. 55: Massenspektren der unbekannten Verbindungen **U4 - U22** aus dem Urinprofil der weiblichen Mausmakis.

8.3 Massenspektren der unbekannten Verbindungen in den Urinprofilen von *M. murinus* und *M. lehilahytsara*

8.3.1 *Microcebus murinus* U23 – U28

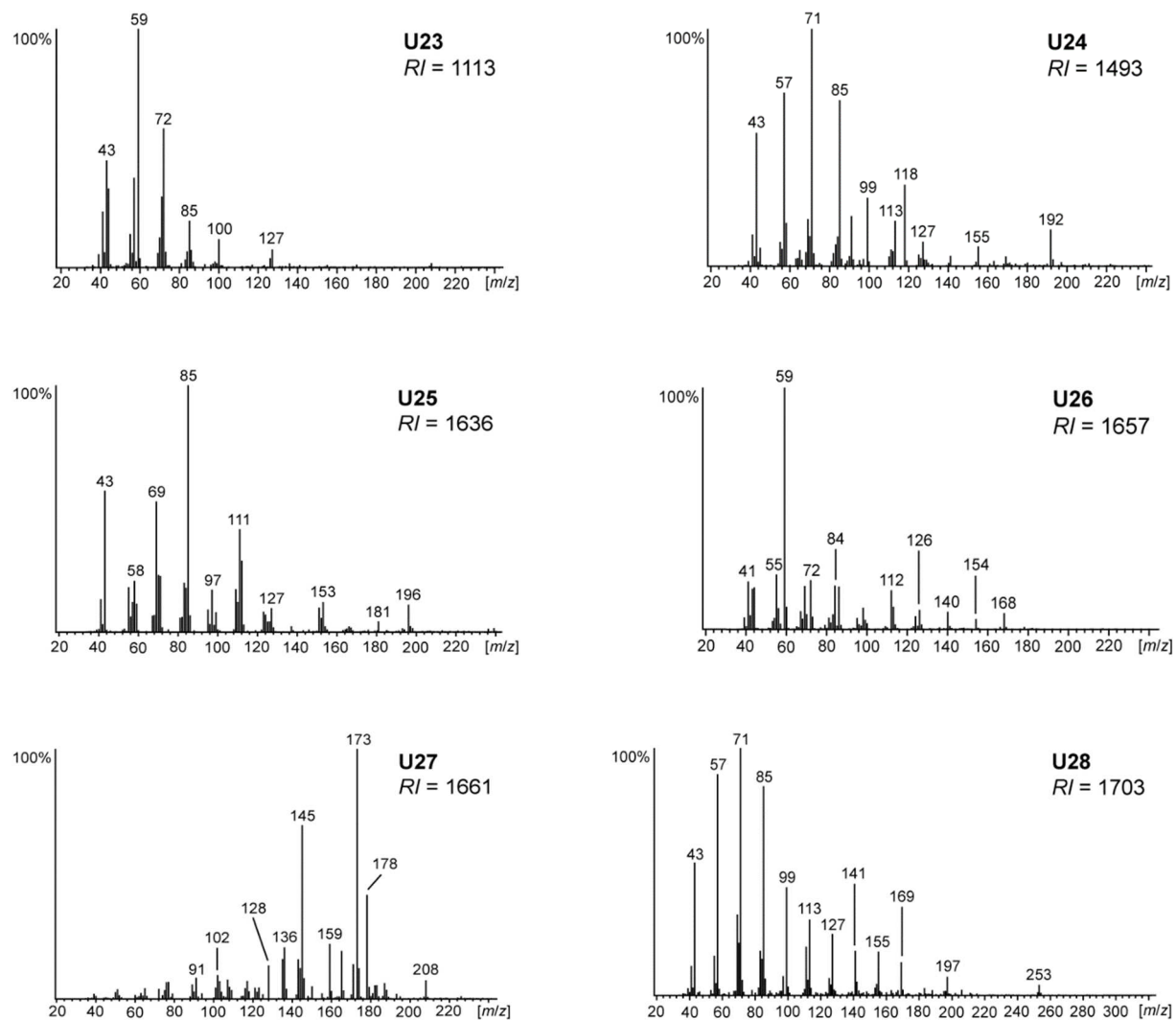


Abb. 56: Massenspektren der unbekannten Verbindungen **U23 - U28** aus dem Urinprofil von *M. murinus*.

8.3.2 *Microcebus lehilahytsara* U29 – U35

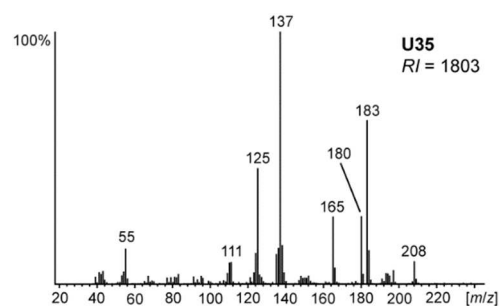
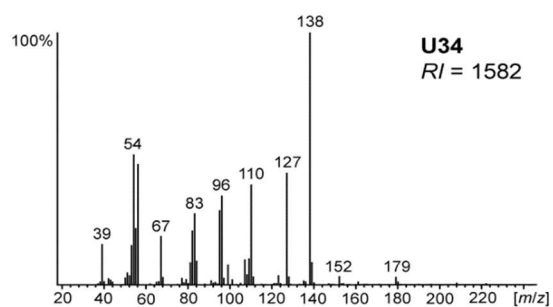
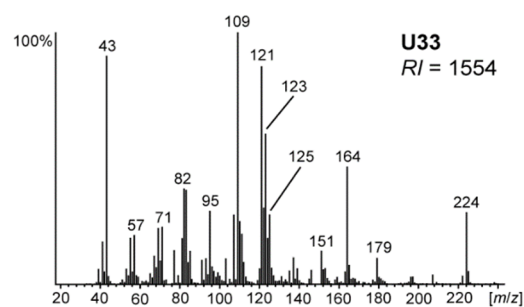
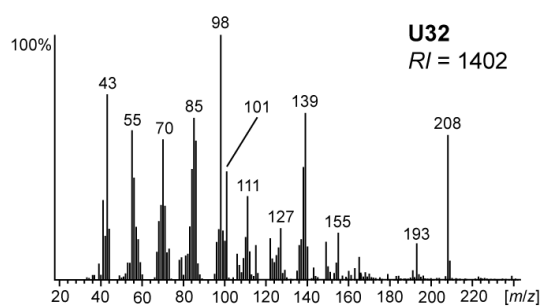
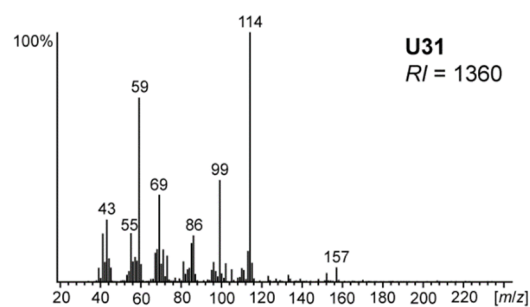
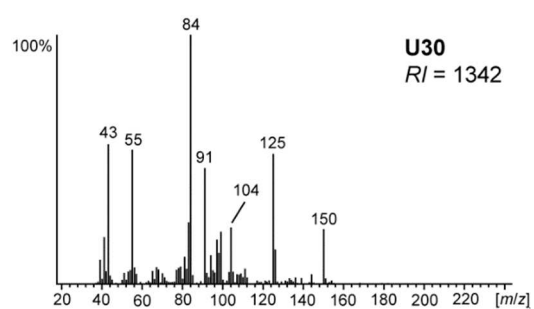
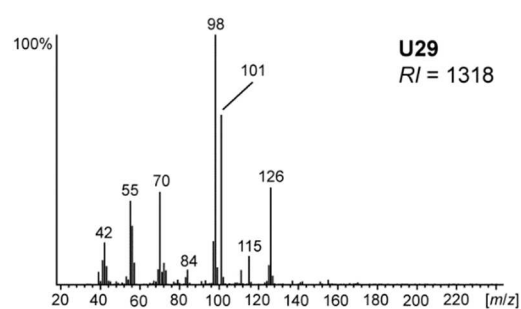


Abb. 57: Massenspektren der unbekannten Verbindungen **U29 – U35** aus dem Urinprofil von *M. lehilahytsara*.

8.4 Auswertung der Urinextrakte Mausmakis – CD

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Stefan Schulz für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Forschungsthemas, sowie die stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Thomas Lindel danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Masao Miyazaki und Prof. Dr. Ute Radespiel danke ich für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.

Den Mitarbeitern der NMR-Spektroskopie- und Massenspektrometrieabteilung danke ich für die Vermessung unzähliger Proben.

Für das schöne Arbeitsklima und für die zahlreichen Anregungen danke ich allen aktiven und ehemaligen Kollegen: Dr. Insa Bergmann, Dr. Hilke Bruns, Serdar Dilek, Tim Gauger, Moritz Gerbaulet, Christopher Grimm, Dr. Ulrike Groenhagen, Tim Harig, Dr. Susann Hötling, Simone Kern, Dr. Julia Kiefer, Janosch Knepper, Dr. Michael Kostka, Diana Koteska, Dr. Michael Maczka, Dr. Florian Mann, Kristina Melnik, Markus Menke, Jasmin Müller, Dr. Alexander Neumann, Dr. Pardha Saradhi Peram, Dr. Vincent Perl, Srinivasa Rao Ravaella, René Röpke, Dr. Anna-Lena von Rymon-Lipinski, Christian Schlawis, Dr. Witali Schmidt, Patrick Stamm, Michael Steinbiß, Daniel Stiller, Martin Stürminger, Dr. Subash Kumar Supraneni, Nargis Khakin Taniwal, Dr. Daiane Szczerbowski Montes Vidal, Dr. Diogo Montes Vidal und Lisa Ziesche.

Allen Praktikanten danke ich für ihren Arbeitseinsatz.

Mein ganz besonderer Dank gilt dem „Chicks Lab“ 324 für die tolle Arbeitsatmosphäre, eure Unterstützung und die musikalische Unterhaltung während der Arbeit.

Insbesondere danke ich Lisa und Kristina, dass sie immer für mich da waren, für ihre Freundschaft und das immer offene Ohr.

Britta, Jaqueline und Grieta danke ich für die unzähligen aufbauenden und mich immer zum Lachen bringenden Nachrichten. Grieta, ich danke dir fürs Zuhören, dein Verständnis und für dein biologisches Fachwissen.

Mein allergrößter Dank gilt meiner Familie. Meinen Eltern, meiner Oma und meinem Freund Lexi für ihre immerwährende Unterstützung, ihr Vertrauen, ihre Motivation, ihr Verständnis und ihre Liebe. Ohne sie wäre die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.